

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität
des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger)

**Einfluss von Induktion und Inhibition der NO-
Synthase und verschiedener Endothelinrezeptoren
auf das Überleben kritisch perfundierter
muskulokutaner Lappenplastiken.**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2010

Vorgelegt von Philipp Johannes Mörsdorf
Geboren am 26.04.1982
in St. Wendel

Meinen Eltern gewidmet

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	3
2.1 Zusammenfassung	5
2.2. Summary	7
3. Einleitung	10
3.1. Plastische Chirurgie	10
3.1.1. Aufgabe und Spektrum der plastischen Chirurgie	10
3.2. Klassifikation von Hautlappen anhand ihrer Blutversorgung	11
3.2.1. Probleme der Defektdeckung mit Nahlappenplastiken	11
3.3. Ischämie-Reperfusion	13
3.3.1. Primäres Perfusionsversagen („no reflow“)	13
3.3.2. Reperusionsparadoxon („reflow paradox“)	14
3.3.3. Chronisch persistierende Ischämie	15
3.4. Strategien zur Reduktion von Lappennekrosen	17
3.4.1. Prävention und Präkonditionierung	17
3.4.2. Regulation des Gefäßtonus	19
3.4.2.1. NO-Synthase	20
3.4.2.2. Endothel und Endothelinrezeptoren	21
4. Ziel der Studie	24
5. Material und Methodik	25
5.1. Versuchstiere	25
5.2. Modell	26
5.2.1. Mikrozirkulationsmodell der chronischen Rückenhautkammer	26
5.2.2. Anästhesie	26
5.2.3. Vorbehandlung	27
5.2.4. Farbstoffe	28
5.2.5. „Random pattern flap“	32
5.2.6. Chirurgischer Eingriff und Lappenpräparation	32
5.2.7. Versuchsprotokoll	37
5.3. Untersuchungsmethoden	38
5.3.1. Mikrozirkulation	38
5.3.2. Mikrozirkulatorische Parameter	43
5.4. Datenauswertung, Datenerfassung und Statistik	47
5.4.1. Datenauswertung	47
5.4.2. Datenerfassung	47
5.4.3. Statistische Bearbeitung	47

5.4.4. Graphische Darstellung	48
6. Ergebnisse	
6.1. Endothelin-Rezeptorblockade	48
6.1.1. Nekrotische Gewebefläche	48
6.1.2. Arteriöläre Fließgeschwindigkeit	49
6.1.3. Arteriölärer Durchmesser	49
6.1.4. Arteriölärer Blutfluss	52
6.1.5. Venuläre Fließgeschwindigkeit	52
6.1.6. Venulärer Durchmesser	52
6.1.7. Venulärer Blutfluss	57
6.1.8. Kapillare Fließgeschwindigkeit	59
6.1.9. Kapillärer Durchmesser	59
6.1.10. Kapillärer Blutfluss	62
6.1.11. Funktionelle Kapillardichte	62
6.1.12. Apoptotischer Zelltod	65
6.1.13. Angiogenese	65
6.2. Induktion und Inhibition der NO-Synthase	67
6.2.1. Nekrotische Gewebefläche	67
6.2.2. Arteriöläre Fließgeschwindigkeit	68
6.2.3. Arteriölärer Durchmesser	68
6.2.4. Arteriölärer Blutfluss	70
6.2.5. Venuläre Fließgeschwindigkeit	72
6.2.6. Venulärer Durchmesser	73
6.2.7. Venulärer Blutfluss	73
6.2.8. Kapillare Fließgeschwindigkeit	76
6.2.9. Kapillärer Durchmesser	76
6.2.10. Kapillärer Blutfluss	79
6.2.11. Funktionelle Kapillardichte	79
6.2.12. Apoptotischer Zelltod	82
6.2.13. Angiogenese	82
7. Diskussion	84
7.1. Diskussion des Modells	84
7.2. Diskussion der Ergebnisse	86
7.2.1. Endothelin-Rezeptorblockade	86
7.2.2. Induktion und Inhibition der NO-Synthase	91
7.3. Schlussfolgerung	98
7.4. Ausblick	99
8. Literaturverzeichnis	102
9. Danksagung	108
10. Lebenslauf	109

2.1. Zusammenfassung

Hintergrund: Im Rahmen der plastischen und rekonstruktiven Lappenchirurgie stellt die inadäquate Perfusion der Wundränder, insbesondere im distalen Lappenanteil, nach wie vor ein ernstzunehmendes Problem dar. Im ungünstigsten Fall führt dies zur Gewebenekrose und zum Verlust des Lappens. Hierbei spielen zahlreiche Faktoren wie beispielsweise Ischämie-induzierte Entzündung oder endotheliale Dysfunktion eine entscheidende Rolle. Vor allem für Letzteres spielen Endotheline (ET) bzw. ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle. Im ersten Teil der hier vorgestellten Studie wurde daher *in vivo* der Einfluss von verschiedenen ET-Rezeptorantagonisten auf die kritische Ischämie in randomisiert durchbluteten Lappen untersucht. Des Weiteren lassen experimentelle Studien der letzten Jahre vermuten, dass Stickstoffmonoxid (NO) die Perfusion durch direkte vasoaktive Wirkung verbessern kann sowie über Freisetzung von VEGF eine Neoangiogenese induziert. Allerdings kann eine vermehrte NO-Freisetzung die Generierung hoch-aggressiver, gewebeschädigender Sauerstoffradikale unterstützen. Im zweiten Teil der hier vorgestellten Studie untersuchten wir daher, inwieweit die Blockade der NO-Synthase mit L-NAME bzw. die Förderung der NO-Produktion durch Behandlung mit L-Arginin die mikrovaskuläre Perfusion eines „random pattern flap“ an der Maus beeinflusst, und inwieweit im Rahmen der chronischen Ischämie eine angiogene Reaktion die Neubildung von Mikrogefäßen bewirkt.

Material & Methoden: An C57BL/6J Mäusen wurde ein lateral gestielter Hautlappen (15 x 11 mm) unter Mitnahme des Panniculus Carnosus gehoben und in eine chronische Rückenhautkammer fixiert. Die Analyse der Mikrozirkulation erfolgte mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10. Hierbei wurde nach Injektion von FITC-Dextran 150,000 die Fläche des nekrotischen Gewebes, der arterioläre Blutfluss und die funktionelle Kapillardichte im kritisch perfundierten, distalen Anteil des Lappens analysiert sowie die Neubildung von Mikrogefäßen bestimmt. Folgende Versuchsgruppen wurden untersucht: (1) BQ 123, ein spezifischer ET-A-Rezeptor-Antagonist (ETA, 1mg/kg, n=6); (2) BQ 788, ein selektiver ET-B-Rezeptor-Antagonist (ETB, 1mg/kg, n=7); (3), PD 142893, ein nichtselektiver ET-AB-Rezeptor-Antagonist (ETAB, 0,5mg/kg, n=7). NaCl-behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n=7). Die Verabreichung der Substanzen erfolgte intraperitoneal jeweils 30min vor Lappenhebung sowie täglich über die folgenden 4 Tage. Im zweiten Versuchsteil wurden zusätzliche Tiere randomisiert und folgenden Versuchsgruppen zugeteilt: (1) L-NAME (i.v.; 30mg/kg KG nach Lappenhebung und an Tag 1,3,5,7 und 10; n=7); (2) L-Arginin (i.p.; 10mg/kg täglich; n=7); (3) Lappenhebung mit Kochsalzbehandlung (Kontrolle; n=7).

Ergebnisse: Im ersten Versuchsteil zeigten die unbehandelten Kontrollen im distalen Lappenanteil über den Versuchszeitraum von 10 Tagen trotz leichtem Anstieg der arteriolen Perfusion ($3978 \pm 1765 \text{ pl/s}$, d10) eine deutliche Einschränkung der nutritiven Perfusion (FKD distal: $32 \pm 18 \text{ cm/cm}^2$, d10). Dieses Perfusionsversagen verursachte eine Lappennekrose von $52 \pm 3\%$. Die Behandlung mit dem selektiven ET-B-Rezeptor-Antagonist führte distal zu einer deutlichen Steigerung des arteriolen Blutflusses ($10399 \pm 5759 \text{ pl/s}$, d10). Hierdurch konnte die Kapillarperfusion auch im kritisch perfundierten distalen Lappenanteil aufrechterhalten werden (FKD distal: $132 \pm 42 \text{ cm/cm}^2$, d10), was letztlich zu einer signifikanten Reduktion der Lappennekrose führte ($25 \pm 4\%$, d10, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Im Gegensatz dazu konnten weder der spezifische ET-A-Rezeptor-Antagonist noch der nichtselektive ET-AB-Rezeptor-Antagonist die arteriolen Perfusion im kritisch perfundierten Lappenanteil gegenüber Kontrollen wesentlich beeinflussen (ETA: $1107 \pm 1107 \text{ pl/s}$, d10; ETAB: $2436 \pm 1818 \text{ pl/s}$, d10). Entsprechend war die Lappennekrose im Vergleich zur Kontrolle nicht reduziert (ETA: $46 \pm 10\%$, d10; ETAB: $51 \pm 7\%$, d10). Im Rahmen der anhaltenden Ischämie über 10 Tage konnte die Ausbildung neuer Gefäße (Knospen und Sprossenbildung) in keinem der Versuchstiere beobachtet werden. In unbehandelten Kontrolltieren des zweiten Versuchsteils zeigte sich nach Lappenhebung ein leichter Anstieg der arteriolen Perfusion über den Versuchszeitraum von 10 Tagen ($2700 \pm 1700 \text{ pl/s}$; d 10), die jedoch einen massiven Ausfall der nutritiven (kapillaren) Perfusion nicht verhindern konnte ($24 \pm 15 \text{ cm/cm}^2$; d 10). Das Perfusionsversagen resultierte in einer distalen Lappennekrose von ca. 45% der Gesamtlappenfläche. Die Blockade der NO-Synthase mit L-NAME bewirkte eine ausgeprägte arteriolen Hypoperfusion ($p < 0.05$) sowie einen nahezu kompletten Verlust der kapillaren Perfusion ($7 \pm 7 \text{ cm/cm}^2$). Entsprechend war die Gewebenekrose im Vergleich zur Kontrolle signifikant stärker ausgeprägt ($67 \pm 5\%$; d 10; $p < 0.05$). Die Applikation von L-Arginin konnte die arteriolen Perfusion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht beeinflussen ($4300 \pm 1800 \text{ pl/s}$; d 10; ns), bewirkte jedoch eine signifikante Verbesserung der kapillaren Perfusion ($153 \pm 39 \text{ cm/cm}^2$; d 10; $p < 0.05$). Nichtsdestotrotz war die Reduktion der Gewebenekrose ($35 \pm 6\%$; d 10; ns) nicht signifikant im Vergleich zu jener in den Kontrolltieren. Die Ausbildung neuer Gefäße konnte trotz der chronischen Ischämie in keinem der Versuchstiere beobachtet werden.

Schlussfolgerung:

Unsere Ergebnisse zeigen, dass endogen gebildetes Stickstoffmonoxid wesentlich an der postoperativen Mikrozirkulationsstörung in kritisch durchbluteten Arealen randomisiert perfundierter myokutaner Lappen beteiligt ist. Die zusätzliche Applikation von NO-Donoren kann lediglich die kapillare Perfusion anhaltend verbessern. Die fehlende signifikante Reduktion der Nekrose nach Arginin-Behandlung ist wohl durch den

gewebescheidigenden Effekt einer vermehrten Sauerstoffradikalbildung trotz Reduktion der chronisch-ischämischen Bedingungen verursacht. Desweiteren zeigten unsere hier vorgestellten Untersuchungen, dass lediglich der selektive ET-B-Antagonist in der Lage ist, in kritisch ischämischen Lappen durch Aufrechterhaltung der nutritiven Perfusion Nekrose signifikant zu verhindern. Der ET-B-Rezeptor könnte daher in Zukunft einen neuen Angriffspunkt in der Behandlung von Patienten mit kritisch perfundierten Lappen darstellen.

2.2. Summary

Background and aims: Insufficient perfusion of distal flap areas, which may lead to partial necrosis, still represents a challenge in reconstructive surgery. In the process of microvascular and endothelial dysfunction, endothelins (ET) and their receptors may play an important role. Therefore, the aim of the first part of our study was to investigate in a chronic *in vivo* model the effect of various ET-receptor antagonists in critically perfused flap tissue. Furthermore, experimental studies of the last few years indicated, that nitric-oxide (NO) can improve the perfusion through direct vasoactive effects and can induce neoangiogenesis through formation of VEGF. However, an increased NO release can support generation of highly aggressive tissue-damaging oxygen-radicals. In the second part of the study we therefore examined whether the blockade of NO-synthase with L-NAME or the induction of NO production by L-ARGININE influence the microcirculation in a critically perfused random pattern flap. Additionally, we analyzed neoangiogenesis by induction and blockade of NO synthase in the chronically ischemic tissue.

Methods: A random pattern musculocutaneous flap was elevated in the back of C57BL/6J mice and fixed into a dorsal skinfold chamber. Repetitive intravital fluorescence microscopy was performed over a 10-day observation period, assessing arteriolar diameter, arteriolar blood flow (aBF), venular diameter, venular blood flow, functional capillary density (FCD), the area of tissue necrosis and the development of newly formed blood vessels. Endothelin receptor blockers were given intraperitoneally 30min before induction of ischemia as well as daily during the subsequent 4-day period, including (i) BQ-123, a specific ET-A-receptor antagonist (ET-A: 1mg/kg, n=6), (ii) BQ-788, a selective ET-B-receptor antagonist (ET-B: 1mg/kg, n=7), and (iii) PD-142893, a non-selective ET-AB-receptor antagonist (ET-AB: 0.5mg/kg, n=7). Animals receiving saline only served as controls (n=7). In the second part of the study animals were randomized and assigned to the following groups: (1)L-NAME (i.v.); 30mg/kg KG after flap preparation and at days 1, 3, 5, 7 and 10; n=7; (2) L-ARGININE (i.p.); 10mg/kg KG daily; n=7; (3) flap preparation

with saline treatment (control); n=7. The analysis of the microcirculation was performed with the help of intravital fluorescence microscopy at day 1, 3, 5, 7 and 10 after surgery. After injection of FITC dextran 150,000 arteriolar, venular and capillary blood flow, area of tissue necrosis, functional capillary density and the formation of new microvessels were analyzed in the flap.

Results: Despite an increase of aBF during the 10-day observation period (day 1: 1920 ± 290 pl/s; day 10: 4700 ± 1640 pl/s), the flaps of saline-treated controls showed a distinct decrease of FCD ($32 \pm 18 \text{ cm/cm}^2$) in distal flap area. This perfusion failure resulted in a flap necrosis of $52 \pm 3\%$. Selective blockade of the ET-B-receptor caused a further increase of aBF already at day 1 ($2.97 \pm 0.42 \text{ nl/s}$), which persisted during the following 10-day observation period (day 10: $5.74 \pm 0.69 \text{ nl/s}$). Accordingly, adequate FCD could be maintained (day 10: $215 \pm 8 \text{ cm/cm}^2$; $p < 0.05$ vs. control), resulting in a significant reduction of flap necrosis (day 10: $25 \pm 4\%$; $p < 0.05$). In contrast, neither selective blockade of the ET-A-receptor nor non-selective ET-A- and ET-B-receptor blockade were able to significantly affect arteriolar blood flow when compared to controls (day 1: ET-A: $1.39 \pm 0.10 \text{ nl/s}$; ET-AB: $1.53 \pm 0.80 \text{ nl/s}$; n.s.). Accordingly, flap necrosis after ET-A- and ET-AB-receptor inhibition did not differ from that of controls (day 10: ET-A: $46 \pm 10\%$; ET-AB: $51 \pm 7\%$). In the second part of our study in untreated control animals we observed after flap preparation an only slight increase of arteriolar perfusion over the time period of 10 days (2700 ± 1700 pl/s; d10), however this could not prevent the massive deficit of the nutritive capillary perfusion ($24 \pm 15 \text{ cm/cm}^2$; d10). The perfusion deficit resulted in a distal flap necrosis of approximately 45 % of the total flap surface. The blockade of the NO-synthase with L-NAME caused a marked arteriolar hypoperfusion ($p < 0.05$) as well as a virtually complete loss of capillary perfusion ($7 \pm 7 \text{ cm/cm}^2$). In comparison to control animals the tissue necrosis was found significantly ($67 \pm 5\%$; d10; $p < 0.05$). The application of L-ARGININE in comparison to untreated controls could not influence arteriolar blood perfusion ($4300 \pm 1800 \text{ pl/s}$; d10), however, caused a significant improvement of capillary perfusion ($153 \pm 39 \text{ cm/cm}^2$; d10; $p < 0.05$). However, the reduction of tissue necrosis was not significant compared to that of control animals ($35 \pm 6\%$; d10). Despite of the chronic ischemic conditions, formation of new blood vessels could not be observed in any of the studied animals.

Conclusion: Our data indicate that only selective ET-B-receptor inhibition is capable of maintaining nutritive perfusion, and, hence, reducing necrosis and apoptotic cell death in critically perfused flap tissue. Accordingly, administration of ET-B-receptor antagonists may be considered in the treatment of critically perfused flaps. Additionally, our results demonstrate that nitric oxide is substantially involved in the microcirculatory disturbance of critically perfused random pattern flaps. Additional application of NO can merely improve

capillary perfusion. The lack of significant reduction of necrosis after treatment with L-ARGININE, despite the reduction of the chronic ischemic conditions, is probably caused by the tissue damaging effect of an increased formation of oxygen radicals.

3. Einleitung

3.1. Plastische Chirurgie

Die Fortschritte in der modernen Medizin führten innerhalb der Chirurgie zu einer zunehmenden Spezialisierung, obwohl gewisse Fachdisziplinen wie beispielsweise die plastische Chirurgie bereits weit vor Christus existierten. Im alten Ägypten und Indien wurden 3000 bis 500 vor Christus erste plastische Eingriffe, allen voran Nasenrekonstruktionen vorgenommen und in alten Schriften wie dem altindischen Ayurveda oder dem ägyptischen Papyrus Eber festgehalten [Krupp 1994]. Grund hierfür waren vor allem die zahlreichen Schwertverletzungen während der Kriege, welche letztlich häufig in einer Nasenspitzenamputation endeten, und daher mit einer entsprechenden Rekonstruktion gedeckt werden mussten. In der Neuzeit wurde der Begriff „plastique“ erstmals 1798 von P.J. Desault geprägt, bevor er dann durch E. Zeis in seinem „Handbuch der plastischen Chirurgie“ 1838 populär gemacht wurde [Zeis 1838]. Seit dem 1. Oktober 1993 wurde die plastische Chirurgie in Deutschland als eigenständige Disziplin von der deutschen Ärztekammer anerkannt.

3.1.1. Aufgabe und Spektrum der plastischen Chirurgie

Stetige Weiterentwicklungen in der Prävention, Früherkennung und Behandlung führen in der heutigen Medizin immer mehr dazu, dass Fehlbildungen, Erkrankungen und Verletzungen, welche früher noch eine infauste Prognose aufwiesen, nun mit einer Verstümmelung oder bleibenden Schäden einhergehen. Die Folge dieses Fortschritts ist, dass diese Menschen die „Folgen und Narben“ zeitlebens mit sich tragen müssen. Eine Tatsache, die sowohl psychische wie auch physische Belastungen für den Menschen darstellt [Gerbert 1995]. So ist mittlerweile bekannt, dass das Streben nach Perfektion und das Verlangen nach Schönsein in unserer Gesellschaft eine immer stärker werdende Rolle spielt und unbewusst viele unserer täglichen Angewohnheiten und Tätigkeiten durch das Streben nach Schönheit und Perfektion gesteuert sind [Siemens 2004]. Letztlich kann die Belastung für den Patienten durch die „körperlichen Entstellungen“ deutlich verringert werden, da solche zuvor angesprochenen Defekte mittels plastischer und rekonstruktiver Chirurgie verbessert oder aber sogar behoben werden können. So beschrieb U. Schmidt-

Tintemann bereits 1970 die Aufgabe der plastischen Chirurgie in ihrer Operationslehre in einem einzigen Satz. „Die plastische und wiederherstellende Chirurgie hat als Ziel die Wiederherstellung von gestörter äußerer Form und Funktion, um damit eine Verbesserung der subjektiven Situation der Patienten zu erreichen.“ [Schmidt-Tintemann 1970; Biemer 1991]. Aus dieser Operationslehre heraus entwickelte sich eine große Anzahl chirurgischer Techniken innerhalb der plastischen Chirurgie, wie z.B. die sogenannten Nahlappenplastiken ("local flaps"). Dabei kann die Einteilung der Nahlappenplastiken entweder nach Art der Blutversorgung, nach Art der verwendeten Gewebebeschaffenheit oder nach Art ihrer Anwendung vorgenommen werden. Im Folgenden soll auf die oben erwähnte Einteilung in Abhängigkeit von der Gefäßanatomie eingegangen werden.

3.2. Klassifikation von Hautlappen anhand ihrer Blutversorgung

Je nach Art ihrer Blutversorgung werden Lappen in folgende Gruppen unterteilt:

- Axial gestielte Lappen mit einer definierten Gefäßversorgung .
- Lappen mit Bindegewebe („Mesolappen“), welche durch im Bindegewebe verlaufende Arterien versorgt werden
- Neurokutane Lappen mit einer Versorgung durch neurokutane Arterien nach dem Prinzip der axial gestielten Lappen
- Muskulokutane Lappen mit einer Versorgung direkt aus der Muskulatur
- Randomisiert durchblutete Lappen („Random pattern flap“), d.h. Lappen mit einer nicht definierten Blutversorgung. Letztere wird lediglich durch den Erhalt einer entsprechend breiten Lappenbasis gewährleistet.

3.2.1. Probleme bei der Defektdeckung mit Nahlappenplastiken

Obwohl die Defektdeckung mit Hilfe solcher Lappenplastiken mittlerweile fast zum Alltag plastischer Chirurgie gehört, kann es immer wieder zu durchblutungsbedingten Problemen kommen. Dazu gehören eine partielle Lappennekrose, Wundheilungsstörungen oder aber eine totale Lappennekrose. An erster Stelle ist hier die totale Lappennekrose zu nennen, welche selbst bei erfahrenen Chirurgen immer noch in ca. 1-5 % der Fälle auftreten kann [Khouri, Cooley et al. 1998; Moran, Nava et al. 2003; Nahabedian, Momen et al. 2004]. Aber auch die partielle Lappennekrose, welche als eigentliches Hauptproblem im Vordergrund steht, findet sich immer noch bei ungefähr 7-20% der freien Lappen [Banic, Boeckx et al. 1995; Wei, Celik et al.

2002] und sogar 20-33% der gestielten Lappen [Moran and Serletti 2001; Tanaka, Yamaguchi et al. 2003] . Alles in allem beobachten wir trotz wissenschaftlichem Fortschritt, den die plastische Chirurgie in den letzten Jahrzehnten gemacht hat, nach Defektdeckung mit gestielten Lappenplastiken oder aber freien Lappen immer noch häufig das Absterben des Lappens. Dabei stellen insbesondere die mit ca. 30 % vertretenen partiellen Lappennekrosen, nicht dagegen die 2 % der totalen Lappennekrose, ein erhebliches Problem dar. Dieses Problem betrifft dabei nicht nur das Gesundheitssystem, welches durch die zahlreichen erforderlichen Folgeoperationen finanziell erheblich belastet wird, sondern auch den Patienten selbst. Für diesen stellen die erwähnten Folgeoperationen ebenfalls eine erhebliche Belastung dar. Außerdem haben sowohl partielle als auch totale Lappennekrosen neben den finanziellen Kosten für das Gesundheitssystem einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Morbidität und Mortalität der behandelten Patienten [Paige, Bostwick et al. 1998; Erni and Harder 2003]. Grund für die verschiedenen Formen des Lappenverlustes ist vor allem eine anhaltende Ischämie der Lappen [Carroll, Carroll et al. 1997; Harder, Amon et al. 2005] bzw. deren kritische Durchblutung über die Ischämiezeit hinaus. So konnte nachgewiesen werden, dass das Ausmaß der Lappennekrose mit der Verfügbarkeit an Gefäßen im Gefäßstiel einhergeht [Pang, Yang et al. 1995]. Desweiteren wird in freien Lappen auch der bereits bekannte und mittlerweile intensiv erforschte Ischämie-Reperfusionsschaden für die Schädigung im Lappengewebe verantwortlich gemacht. In gestielten Lappenplastiken führt insbesondere die kritische und chronische Ischämie zu einer fehlenden Reperfusion, welche in einem deutlichen Gewebeschaden bzw. einer Lappennekrose mündet. Im Gegensatz zu dem eigentlichen Reperfusionsschaden, der durch freie Sauerstoffradikale [Im, Manson et al. 1985] und weitere proinflammatorische Mediatoren [Manson, Anthenelli et al. 1983; Manson, Narayan et al. 1986], welche letztlich eine Gewebeschädigung im gesamten Flap zur Folge haben [Menger, Steiner et al. 1992; Menger and Vollmar 1996; Eppihimer and Granger 1997], hervorgerufen wird, kommt es bei der chronischen Ischämie in gestielten Lappen in erster Linie zu einer fehlenden Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und weiteren für das Überleben und den Stoffwechsel notwendigen Substanzen.

3.3. Ischämie-Reperfusion

Die kritische Verminderung bzw. die Unterbrechung der arteriellen Perfusion eines Gewebes, wie sie z.B. bei freien Lappenplastiken vorkommt, wird als Ischämie bezeichnet. Als Folge entwickelt sich im betroffenen Gewebe eine Hypoxie, welche Veränderungen im zellulären Stoffwechsel zur Folge hat. Unter anderem erfolgt die Umstellung des effizienten aeroben Zellstoffwechsels auf die wesentlich ineffizientere anaerobe Glykolyse. Als Folge werden weniger energiereiche Substrate produziert und vermehrt saure Metabolite angesammelt, welche aufgrund der fehlenden Perfusion nicht mehr abtransportiert werden können. Folge ist eine intrazelluläre Azidose, die zur zellulären Funktionsbeeinträchtigung oder aber zur Schädigung von Membranstrukturen mit vollständigem Funktionsverlust führen kann. Aufgrund der mangelhaften Energieausbeute aus der ineffizienten anaeroben Glykolyse erliegt nach dem Aufbrauchen der energiereichen Phosphatreserve die Na^+/K^+ -ATPase [Silver 1977]. Saure Metabolite, welche aufgrund fehlender Perfusion nicht mehr abtransportiert werden können, kumulieren und gleichzeitig nehmen energiereiche Substrate ab. Die Folge ist eine intrazelluläre Azidose. Letztlich kann das Membranpotential der Zelle nicht mehr aufrechterhalten werden und es strömen Natrium- und Chloridionen nach intrazellulär. Diesen Ionen folgt passiv freies Wasser und als Folge der Verschiebung von Flüssigkeit nach intrazellulär entwickelt sich ein intrazelluläres Ödem [Leaf 1973; Clemens, McDonagh et al. 1985], ein Anschwellen von Endothelzellen [Menger, Sack et al. 1989; Menger, Steiner et al. 1992] und eine intravaskuläre Hämokonzentration [Menger and Messmer 1993].

Prinzipiell besteht jedoch nach jeder ischämischen Beeinträchtigung die Möglichkeit, die Perfusion in ischämischem Gewebe wiederherzustellen. Dieses Phänomen, welches dazu führt, dass sich die Stoffwechsellage wieder normalisiert, wird als Reperfusion bezeichnet. In Ausnahmefällen kann diese Reperfusion jedoch auch ausbleiben. Man spricht dann von einem primären Perfusionsversagen oder aber von „no reflow“ [Ames, Wright et al. 1968]. Entwickelt sich trotz vorhandener Reperfusion ein Fortschreiten des ischämischen Schadens, bezeichnet man diese Progression als „reflow paradox“ [Menger, Pelikan et al. 1992].

3.3.1. Primäres Perfusionsversagen („no reflow“)

Als Ursache für das sogenannte primäre Perfusionsversagen werden zahlreiche teils synergistisch wirkende Pathomechanismen diskutiert. Wie bereits oben beschrieben, führen eine Hämokonzentration [Hammersen, Unterberg et al. 1988; Menger and

Messmer 1993], eine durch Hypoxie und Azidose getriggerte erhöhte Blutzellrigidität [Schmid-Schonbein, Sung et al. 1981; Schmid-Schonbein 1987] sowie eine Aktivierung von Leukozyten zu einer massiven Verschlechterung der Rheologie [Menger, Barker et al. 1992]. Darüber hinaus kommt es auch aufgrund der intrazellulären Flüssigkeitsverschiebung zu einer Endothelzellschwellung mit daraus folgender Gefäß- bzw. Kapillareinengung. Folglich muss der Druck, welcher für eine ausreichende Perfusion nötig ist, erhöht werden [Slaaf, Reneman et al. 1987]. Beide der oben genannten Faktoren führen dazu, dass Reperfusion und Überwindung der Scherkräfte in Kapillaren des ischämischen Gewebes nicht mehr möglich sind. Bereits in zahlreichen Studien konnte die Bedeutsamkeit der beiden Faktoren bewiesen werden. So z.B. durch Mazzoni, der durch Behandlung mit hypertonen Lösungen, welche einem Ödem der Endothelzellen entgegenwirkten, ein Versagen der Mikrozirkulation verhindern konnte [Mazzoni, Borgstrom et al. 1990]. Aber auch die isovolämische Hämodilution führt zu einer Verbesserung der Rheologie und einer Prävention des Mikrozirkulationsversagens [Menger, Sack et al. 1988].

3.3.2. Reperusionsparadoxon („reflow paradox“)

Die mikrozirkulatorischen Schäden, welche erst nach Beginn der Reperfusion auftreten und die man vom primären ischämischen Perfusionsausfall abzugrenzen versucht, wurden unter dem Begriff des Reperusionsparadoxon zusammengefasst. Dieses „reflow paradox“ soll die grundlegend unterschiedliche Pathophysiologie von Ischämie und Reperfusion verdeutlichen [Menger, Pelikan et al. 1992]. Im Laufe der Reperfusion gelangt durch die Wiederaufnahme der arteriellen Blutversorgung molekularer Sauerstoff in das postischämische Gewebe und induziert durch Aktivierung der Xanthin-Oxidase die Produktion von Hypoxanthin und Harnsäure. Eng damit verbunden ist auch die Freisetzung von aggressiven Sauerstoffradikalen [Granger, Rutili et al. 1981]. Diese Sauerstoffradikale, zu denen z.B. Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl-Radikale [Grisham, Hernandez et al. 1986] gehören, können über eine Lipidperoxidation die Zellmembranen schädigen [McCord 1986] und so den bereits durch die eigentliche Ischämie entstandenen Schaden weiter verstärken. Aber auch die Aktivierung von neutrophilen Leukozyten durch Sauerstoffradikale [Grisham, Hernandez et al. 1986; Kaminski, Bonda et al. 2002; Kevin, Novalija et al. 2005] spielt neben der Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen [Patel, Zimmerman et al. 1991; Beauchamp, Richard et al. 1999; Fan, Sun et al. 2002] eine bedeutende Rolle. Die Folge ist eine verstärkte Adhärenz von Leukozyten am mikrovaskulären Endothel sowie deren

Migration in das umliegende Gewebe. Dort können entweder Sauerstoffradikale [Grisham, Hernandez et al. 1986] [Fan, Sun et al. 2002] bzw. teils selbst aggressiv und chemotaktisch wirkenden Mediatoren wie z.B. Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF) [Lewis, Whatley et al. 1988] oder Leukotriene [Lehr, Guhlmann et al. 1991] entstehen. Folge dieser Mediatoren ist die erneute Aktivierung weiterer Leukozyten und deren Akkumulation im geschädigten Gewebe. Letztlich bildet sich ein sich selbst unterhaltender *circulus vitiosus*, in dem permanent neue Sauerstoffradikale gebildet und Leukozyten aktiviert werden [Menger and Vollmar 1994]. Folge der Freisetzung der erwähnten zytotoxischen Granula und der Bildung aggressiver Sauerstoffmetabolite ist eine weitere Gewebeschädigung [Weiss 1989], eine massive Erhöhung der Endothelpermeabilität [Mazzoni, Borgstrom et al. 1990] sowie eine Zunahme des interstitiellen Ödems.

3.3.3. Chronisch persistierende Ischämie

Während die beiden zuvor beschriebenen Phänomene des „no-reflow“ und des „reflow paradox“ eher bei freien Lappen zu finden sind, in denen nach Hebung eine kurzzeitige Unterbrechung der Perfusion mit anschließender Reperfusion entsteht, spielt für die Nekroseentstehung bei gestielten Lappen die chronische bzw. persistierende Ischämie die entscheidende Rolle. Vor allem in dem von uns verwendeten randomisiert durchbluteten Lappen, in denen wie bereits erwähnt die Perfusion auf dem Gesetz des Zufalls beruht und lediglich aus der Lappenbasis hervorgeht [A. Hirner 2008], entwickelt sich in den distalen Lappenanteilen aufgrund der räumlichen Entfernung zur Lappenbasis die Ausbildung einer chronischen Ischämie. Diese Ischämie und die damit unzureichend gewährleistete Blutversorgung im distalen Anteil wird neben zahlreichen anderen Faktoren wie beispielsweise der durch die Ischämie induzierten Inflammation und der Produktion freier Sauerstoffradikale für die Entstehung einer Lappennekrose verantwortlich gemacht. Die chronische Ischämie im distalen Lappenanteil bewirkt unter anderem eine endotheliale Dysfunktion, welche mit einem Anstieg des lokalen Gefäßwiderstandes einhergeht [Komorowska-Timek, Timek et al. 2004]. Dies resultiert in einem erhöhten Thrombembolierisiko, da ein erhöhter Gefäßwiderstand zu einer deutlichen Verringerung der Abwehrmechanismen gegen eine Thrombenausbildung führt [Alizadeh, Pittet et al. 2004]. Diese Thromben können die oben beschriebene bereits vorhandene Ischämie entweder verstärken oder aber nach ihrer Auflösung das Gewebe durch einen Ischämie-Reperfusions-Schaden schädigen. Des weiteren spielt

auch die unzureichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff eine bedeutende Rolle bei der durch chronische Ischämie induzierten Nekrose [Pang, Yang et al. 1995; Carroll, Carroll et al. 1997]. Die genauen Mechanismen, welche für die Schädigung des Lappengewebes durch chronische Ischämie verantwortlich gemacht werden, wurden an Lappen bislang noch nicht genau untersucht. Jedoch wurde an anderen Organen wie beispielsweise Hirn, Herz und Niere die Auswirkung einer chronischen Ischämie bereits hinlänglich untersucht. So konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, dass eine chronische Ischämie am Hirn mit einer deutlichen kognitiven Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktion einhergeht [de la Torre, Cada et al. 1997]. In einem weiteren Projekt an Ratten konnte ebenfalls ein kognitives Defizit als Folge einer chronischen zerebralen Ischämie aufgezeigt werden [Cai, Pang et al. 2001]. In einem Tiermodell der chronischen Ischämie an der Niere von Ratten konnte aufgezeigt werden, dass als Folge einer unzureichenden Durchblutung die betroffene Niere atrophiert [Konopka, Jurach et al. 2007]. Am Herzen wurde in einem Tiermodell an der Ratte nachgewiesen, dass eine andauernde Ischämie einen deutlichen Abfall der Ejektionsfraktion, einen Anstieg des diastolischen Volumens im linken Ventrikel sowie eine deutliche Änderung der kardialen Globalfunktion bewirkt [Fang, Tang et al. 2006]. Auch bei Patienten mit pAVK konnte die negative Auswirkung einer bestehenden und andauernden chronischen Ischämie bereits vielfach aufgezeigt werden.

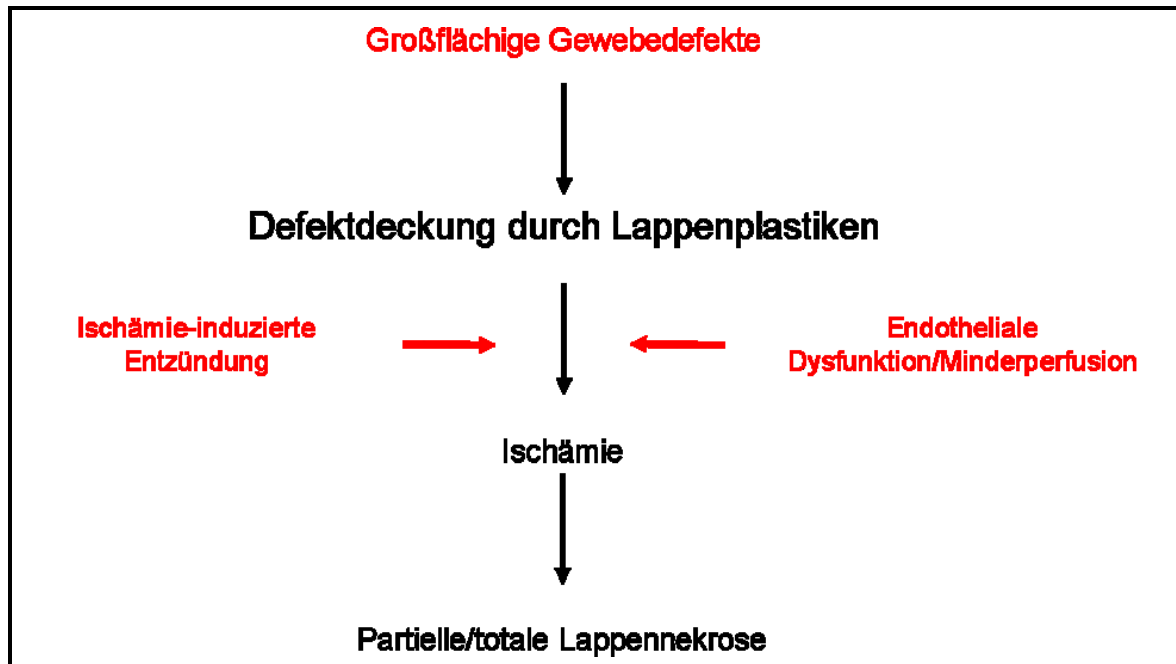


Abb. 1 : Schematische Darstellung der Probleme, welche bei Defektdeckung mit Lappenplastiken auftreten können. Sowohl die ischämieinduzierte Entzündung („reflow paradox“) als auch die endotheliale Dysfunktion mit fehlender oder nicht ausreichender Durchblutung führen zu weiterer Ischämie und letztlich zum Absterben des Lappens bzw. dessen partieller Nekrose.

3.4. Strategien zur Reduktion von Lappennekrosen

3.4.1. Prävention und Präkonditionierung

Die partielle bzw. totale Lappennekrose stellt in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie nach wie vor ernstzunehmendes Problem dar. Die werden sowohl durch Ischämie-induzierte Entzündung als auch durch endotheliale Dysfunktion verursacht (s.Abb.1). Bereits in vorherigen Studien am Gehirn konnte der Begriff der sogenannten Penumbra, einer Zone die erstmals in ischämischem Hirngewebe identifiziert wurde, definiert werden [Astrup, Siesjo et al. 1981]. In dieser kritisch durchbluteten Zone ist prinzipiell eine Wiederherstellung der Gewebefunktion möglich, sofern dieses in einer bestimmten Zeit wieder adäquat durchblutet wird [Jones, Morawetz et al. 1981]. In muskulokutanem Gewebe konnte ebenfalls eine solche Zone, die sogenannte „Falx lunatica“ aufgezeigt werden, welche potentiell noch vor einer Nekroseausbildung bewahrt werden kann [Harder, Amon et al. 2005].

Da innerhalb der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie die Defektdeckung mittels Lappen in der Regel einen elektiven Wahleingriff darstellt, wäre es wünschenswert, bereits im Vorfeld eine Möglichkeit zu finden, um die oben genannte Zone der „falx

lunatica“ vor einer Nekroseentstehung zu bewahren. Ideal wäre es demnach, eine möglichst einfache, rasche und effiziente Methode der Gewebepräkonditionierung zu entwickeln. Da es sich bei Haut und Muskel im Gegensatz zu Herz, Leber und anderen Organen um oberflächliche Organe handelt, sollte eine solche Präkonditionierung im Gegensatz zu den letzteren genannten Organen durchaus möglich sein. Bereits 1974 wurde eine solche Möglichkeit, das sogenannte „surgical delay“, näher beschrieben [Reinisch 1974]. Dabei wird das zur Defektdeckung geplante Gewebe in mehrere Schritte gehoben, um das Auftreten einer partiellen Nekrose, insbesondere des distalen Lappenanteils, zu verringern (s. Abb. 2).

Eine weitere interessante Möglichkeit dem mikrovaskulären Perfusionsversagen entgegenzuwirken, stellt die Präkonditionierung des Gewebes dar. Darunter versteht man verschiedene Behandlungsstrategien, welche letztlich ein gemeinsames Ziel haben. Erstmals wurde dieses Prinzip von Murry untersucht, der am Myokard aufzeigen konnte, dass das repetitive Verschließen der afferenten Gefäße dem durch Ischämie drohenden Schaden vorbeugen kann [Murry, Jennings et al. 1986]. Dabei wurde sich zu Nutzen gemacht, dass kurzzeitige Ischämie in einem Gewebe eine Toleranz induzieren kann. Dieser Effekt konnte nicht nur am Myokard sondern auch am Gehirn [Glazier, O'Rourke et al. 1994], Muskel [Pang, Yang et al. 1995; Hotter, Closa et al. 1996], Darm [Hotter, Closa et al. 1996], Leber [Peralta, Closa et al. 1996], Lunge und an der Niere [Du, Hicks et al. 1996; Turman and Bates 1997] nachgewiesen werden.

Neben diesen beschriebenen Möglichkeiten der Präkonditionierung, die sich mit der Toleranzentwicklung gegenüber Ischämie durch repetitive Phasen von kurzer Ischämie befassten, wurden aber auch noch zahlreiche weitere Strategien zur Prävention und Präkonditionierung beschrieben. Dabei spielt das Konzept des supraphysiologischen Stresses eine besondere Rolle. Durch diesen Stress kann zum einen eine Ischämietoleranz induziert werden und zum anderen der Erhalt der Mikrozirkulation gewährleistet werden. So konnte gezeigt werden, dass die präoperative Exposition gegenüber Hitze bzw. Kälte dem durch chronische Ischämie verursachten Gewebeschaden entgegenwirken kann [Liu, Engelman et al. 1992; Yunoki, Nishio et al. 2002]. Aber auch die pharmakologische Vorbehandlung wurde bereits mehrfach untersucht. Dabei wurden unter anderem die protektiven Eigenschaften von Wachstumsfaktoren und verschiedenen weiteren Substanzen beschrieben [Cleveland, Meldrum et al. 1997; Riepe, Esclaire et al. 1997; Friehs, Moran et al. 2004]. Diese Substanzen, welche im Vorfeld des Eingriffes systemisch verabreicht werden können, beinhalten unter anderem i) antioxidative Substanzen, die vor allem das Reperfusion-Paradoxon und dessen Schaden verhindern sollen, ii)

Substanzen, die einen Erhalt der Perfusion im kritisch perfundierten Lappenanteil anstreben sowie iii) angiogene Substanzen, welche über Angiogenese die Perfusion steigern sollen. Der Ansatz der Durchblutungserhaltung durch Pharmaka nach Lappenhebung scheint besonders attraktiv zu sein, da der Gefäßdurchmesser nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz eine bedeutende Rolle für die Lappenperfusion spielt. Schließlich geht der Radius mit der vierten Potenz in deren Berechnung ein [Klinke 2001]. Da im menschlichen Körper zahlreiche Faktoren dazu beitragen, den Gefäßtonus zu steuern, ergeben sich gleich mehrere pharmakologische Möglichkeiten und Ansatzpunkte, die Gefäße im kritisch perfundierten Gewebe zu dilatieren.

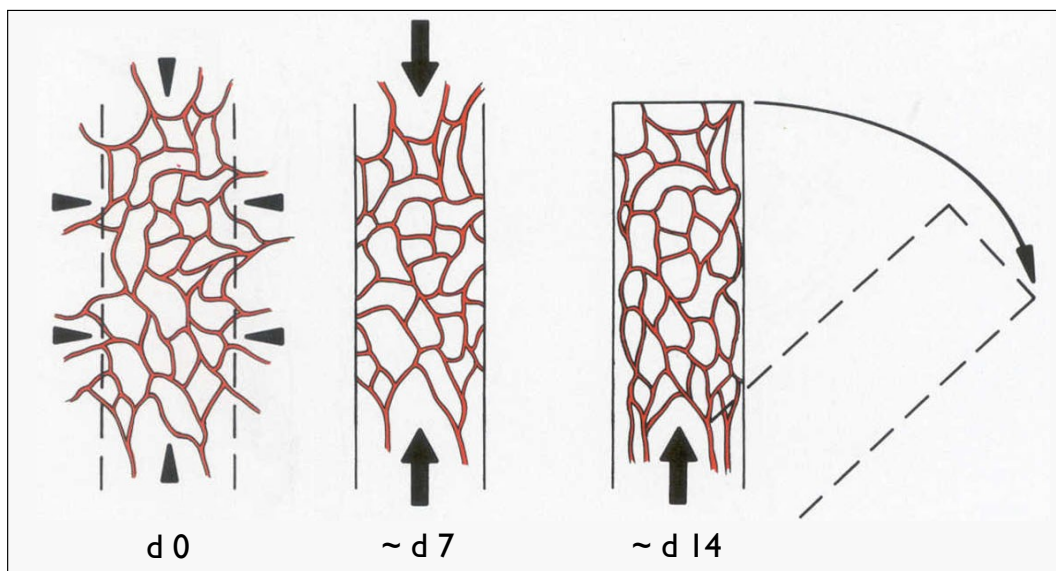


Abb. 2 : Schematische Darstellung des „surgical delay“. In einem ersten Schritt erfolgt lediglich eine teilweise Lappenhebung. Nach einer Latenz von ca. 14 Tagen und einer Regeneration des zuvor ischämischen Gewebes mit verbesserter mikrovaskulärer Perfusion erfolgt die definitive Lappenhebung und daraufhin die geplante Weichteildeckung mit Hilfe des Lappens.

3.4.2. Regulation des Gefäßtonus

Die Regulation von Gefäßtonus und Gefäßdurchmesser im menschlichen Körper dienen dazu, den systemischen Blutdruck zu regulieren und gleichzeitig eine adäquate Perfusion von Gewebe zu gewährleisten. Dabei bestimmen sowohl die Kontraktion als auch die Dilatation der Arteriolen den Blutfluss. Das präzise abgestimmte Zusammenspiel von Vasodilatation und Vasokonstriktion sorgt dafür, dass auch in distal gelegenen Gewebearealen eine ausreichende Durchblutung gewährleistet ist.

Um diese Aufgaben zu bewältigen verfügt das Endothel über unterschiedliche Membranrezeptoren sowie Sensoren, über das es verschiedene hämodynamische und humorale Reize aufnehmen und weiterverarbeiten kann, wie beispielsweise Acetylcholin und Bradykinin, vasoaktive Lokalhormone, sogenannte Autakoide, wie NO (Stickstoffmonoxid) bzw. EDRF (endothelial derived relaxing factor) oder Prostazyklin. Einen weiteren wichtigen und daher nicht zu vernachlässigenden Parameter bei der Regulation des Gefäßtonus stellt die Hämodynamik dar, zu der z.B. hohe Flussraten und intravasaler Druckanstieg zählen.

3.4.2.1. NO-Synthase

NO, was mit EDRF gleichzusetzen ist, zählt seit seiner Entdeckung im Jahre 1980 [Furchgott and Zawadzki 1980] zu den bedeutendsten Vasodilatoren. NO wird dabei als einer der entscheidenden Mediatoren angesehen [Palmer, Ferrige et al. 1987]. Es ist ein Produkt aus der körpereigenen Aminosäure L-Arginin und wird von der sogenannten endothelialen NO-Synthase gebildet (s. Abb. 3). Bei der Entstehung wird L-Arginin durch das Enzym NO-Synthase, von dem verschiedene Isoenzyme existieren [Forstermann, Pollock et al. 1994], in NO und L-Citrullin gespalten [Palmer, Rees et al. 1988]. Da das daraus gebildete NO ein hochdiffusibles Gas ist, kann es die Zellmembran leicht überwinden und in das Zytoplasma nahegelegener Gefäßmuskelzellen diffundieren. Dort aktiviert es die zytosolische Guanylatzyklase und führt zu einer vermehrten Umwandlung von GTP zu cGMP [Karrow Thomas 2007], welches wiederum zu einer Aktivierung der Proteinkinase G führt. Verschiedene Zielproteine werden somit phosphoryliert. Dadurch werden intrazelluläre Kalzium sowie Kalium-Kanäle aktiviert [Mackie, Lai et al. 1986; MacMillan-Crow, Murphy-Ullrich et al. 1994]. Diese hyperpolarisieren die Gefäßmuskelzellen (VMSCs), was zu einem Abfall der freien Ca^{2+} -Konzentration führt [Waldman and Murad 1988] und schließlich mit einer Kontraktionsabnahme und Vasodilatation einhergeht [Hassid and Oudinet 1986]. Weiter führt das von der NO-Synthase aus L-Arginin produzierte NO aber auch intraluminal über die Guanylatzyklase zur Aggregations- und Adhäsionshemmung von Thrombozyten (s. Abb. 3) [Randomski 1991]. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO im Organismus bedient man sich bei der Erforschung des NO-Systems *in vivo* der Gabe von verschiedenen NO-Synthaseantagonisten. Meist erfolgte die Blockade der NO-Synthase dabei intraarteriell bzw. intravenös am Unterarm mit N-Monomethyl-L-Arginin oder aber mit N-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME). Letzteres ist ein Analogon der nicht essentiellen Aminosäure L-Arginin und

blockiert als kompetitiver Antagonist sämtliche vorhandene Isoenzyme der NO-Synthase. Nach systemischer Gabe solcher Antagonisten am Menschen wurden sowohl ein Anstieg des Blutdrucks als auch eine Zunahme des peripheren Gefäßwiderstandes beobachtet [Haynes, Noon et al. 1993].

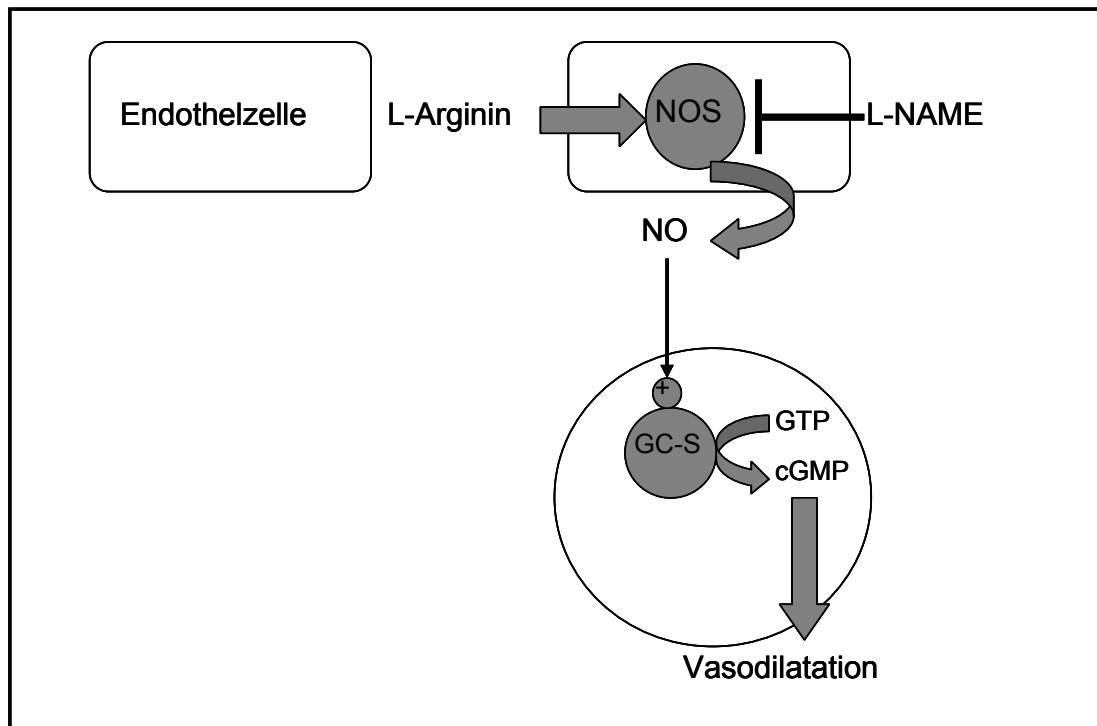


Abb. 3 : Schematische Darstellung des NO-Systems und der daraus vermittelten Vasodilatation. L-Arginin dient als Substrat der NO-Synthase und setzt in der Folge vermehrt NO frei, welches anschließend über die Guanylatzyklase zur vermehrten Bildung von cGMP führt. Dies resultiert daraufhin in einem Abfall der Calciumkonzentration und einer Dilatation der Gefäße. L-NAME dagegen dient als kompetitiver Antagonist der NO-Synthase und verhindert die Vasodilatation.

3.4.2.2. Endothel und Endothelinrezeptoren

Bei der Regulation von Gefäßtonus und Blutdruck spielen die Endothelzellen eine bedeutende Rolle [Hickey, Rubanyi et al. 1985]. Im Jahre 1988 isolierten Yanagisawa und Mitarbeiter aus den Endothelzellen von Schweineaorten ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches sowohl an Venen als auch an Arterien eine starke vasokonstriktorische Wirkung zeigte [Yanagisawa, Kurihara et al. 1988]. Dieses Peptid wurde aufgrund der Lokalisierung an Endothelzellen als Endothelin bezeichnet.

Mittlerweile sind 3 verschiedene Endotheline bekannt, welche sich lediglich in wenigen Aminosäuren unterscheiden. Im menschlichen Körper stellt das Endothelin 1 (ET1) die dominierende Form dar. Aktives Endothelin kann an zwei unterschiedliche Gq-gekoppelten und membranlokalisierten Rezeptoren binden. Zum Einen den Endothelin-A-Rezeptor (ETA-Rezeptor) und zum anderen den Endothelin-B-Rezeptor (ETB-Rezeptor) [Arai, Hori et al. 1990; Sakurai, Yanagisawa et al. 1990]. Die Bindung von Endothelin an den ETA-Rezeptor bewirkt eine Konstriktion der glatten Muskelzellen und somit eine Vasokonstriktion [Filep, Sirois et al. 1991; Hirata, Emori et al. 1993], was eine Folge der Phosphorylierung von PIP zu IP3 und somit einer vermehrten Ca^{2+} -Freisetzung ist. Der erhöhte Kalziumgehalt führt zur Muskelkontraktion und somit zur Vasokonstriktion. Die Endothelzellen dagegen besitzen lediglich den ETB-Rezeptor. Dort führt die Bindung von Endothelin an den ETB-Rezeptor zu einer Aktivierung der NO-Synthase. Als Folge entstehen Prostazyklin und NO. Dies bewirkt ein Erschlaffen der Muskelzellen sowie eine Vasodilatation des betreffenden Gefäßes (s. Abb. 4). Es konnte allerdings auch nachgewiesen werden, dass der ETB-Rezeptor auch auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird und dort ebenso wie der ETA-Rezeptor vasokonstriktorisch wirken kann [Pollock and Opgenorth 1993]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der ETB-Rezeptor als „clearance receptor“ dient, dessen Blockierung die Akkumulation von intravenösem ET-1 hemmt [Fukuroda, Fujikawa et al. 1994]. Es ist weiter bekannt, dass Endothelin-1 nach Lappenhebung in ischämischem Gewebe vermehrt exprimiert wird. So konnten nach operativen Eingriffen lokal jedoch nicht systemisch in den gehobenen Lappenplastiken erhöhte Endothelinspiegel nachgewiesen werden [Matsuzaki 1993; Inoue, Aihara et al. 1998; Mobley, Glassberg et al. 2003].

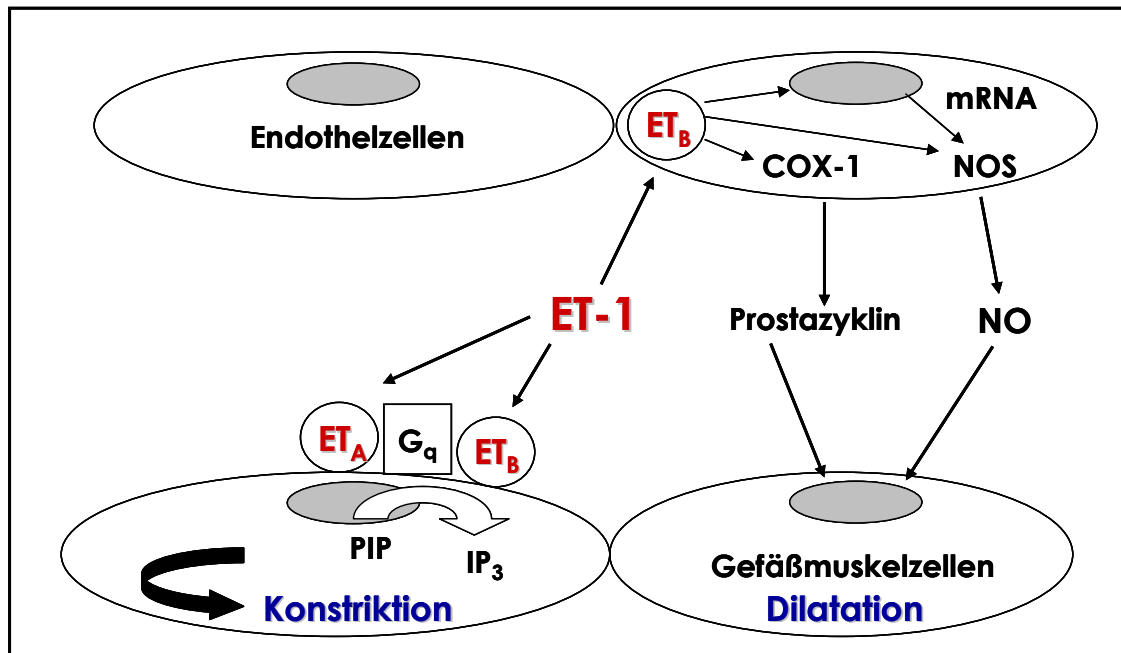


Abb. 4 : Schematische Darstellung des Endothelinsystems, dessen Rezeptoren und ihrer unterschiedlichen Wirkmöglichkeiten. Vasokonstriktion wird sowohl über den ET_A-Rezeptor als auch über den ET_B-Rezeptor vermittelt, welche G_q-gekoppelt über die Freisetzung von IP₃ zu einer Konstriktion der Gefäßmuskelzellen führen. Die ET_B-Rezeptoren der Endothelzellen können über die Produktion von Prostazyklin und Autakoiden wie NO zu einer Erschlaffung der Gefäßmuskelzellen und somit zu einer Dilatation der Gefäße führen.

4. Ziel der Studie

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie sollte untersucht werden, inwieweit die medikamentöse (Prä-)Konditionierung das Überleben und die Nekroseentwicklung von randomisiert durchbluteten muskulokutanen Lappenplastiken positiv beeinflussen kann.

Dazu wurden einerseits L-Arginin als Substrat der NO-Synthase und L-NAME als deren kompetitiver Antagonist und andererseits bestimmte Antagonisten an den bereits beschriebenen einzelnen Endothelinrezeptoren verwendet.

Im ersten Teil der Studie wurde mittels verschiedener Antagonisten an den Endothelinrezeptoren der Einfluss auf das Überleben der Lappenplastiken bzw. eine mögliche Protektion letzterer untersucht. Dabei kamen ein selektiver ETA-Rezeptorblocker, ein selektiver ETB-Rezeptorblocker und ein kombinierter Endothelinrezeptorblocker zum Einsatz.

Im zweiten Versuchsteil wurde untersucht inwieweit eine mögliche Gefäßdilatation durch Induktion der NO-Synthase mittels L-Arginin, dem Donor des relativ kurzlebigen autakoiden endothelialen Vasodilatators NO, bzw. eine Konstriktion durch die Inhibition der NO-Synthase, das Überleben in kritisch perfundierten Lappen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde verschiedenen Tieren einerseits L-Arginin als Substrat der NO-Synthase in 2 unterschiedlichen Dosierungen verabreicht, um herauszufinden, ob bei den L-Arginin-vermittelten Effekten dosisabhängige Unterschiede festgestellt werden können. Andererseits wurde den Versuchstieren L-NAME als kompetitiver Antagonist zu Blockade des Enzyms verabreicht.

Nach der jeweiligen Konditionierung und Präparation der Lappenplastik wurden an definierten Tagen nach Lappenhebung (Tag 1, 3, 5, 7, 10) intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden mit Hilfe der Analyse von Hämodynamik, Entzündungsparametern, Angiogenese und nekrotischer Gewebefläche insbesondere folgende Fragestellungen näher untersucht:

1. Kann durch Induktion der NO-Synthase bzw. durch Endothelinrezeptorblockade die Lappennekrose reduziert werden?
2. Beeinflusst die Induktion der NO-Synthase bzw. die Endothelinrezeptorblockade die arterioläre, venuläre und kapillare Fließgeschwindigkeit?
3. Beeinflusst die Induktion der NO-Synthase bzw. die Endothelinrezeptorblockade den Durchmesser und den Fluss in Arteriolen, Venulen und Kapillaren?

4. Beeinflusst die Induktion der NO-Synthase bzw. die Blockade der Endothelinrezeptoren die Anzahl der apoptotischen Zellen?
5. Kann die Induktion der NO-Synthase bzw. die Endothelinrezeptorblockade die Angiogenese fördern?
6. Kann die Induktion der NO-Synthase bzw. die Endothelinrezeptorblockade die ischämieinduzierte Inflammation bzw. die getriggerte endotheliale Dysfunktion reduzieren?

5. Material und Methoden

5.1. Versuchstiere

Sämtliche Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Eine Überprüfung und Genehmigung seitens der saarländischen Tierschutzkommission fand statt. Über den gesamten Versuchszeitraum dienten 55 C57/BLJ6-Mäuse aus der hauseigenen Zucht des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland), als Versuchstiere. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 22-25 g, was einem Alter von 2,5-3 Monaten entspricht. Während des Versuchs befanden sich die Tiere in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. Sie standen während des gesamten Versuchszeitraums unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten Frau Dr. med. vet. Frings.

Die Haltung der Tiere erfolgte jeweils in Einzelkäfigen, wobei sowohl eine konstante Raumtemperatur von 22-24°C als auch eine relative Luftfeuchtigkeit von 60-65% gewährleistet wurde. Mittels elektronischer Zeitschaltuhr wurde für die Tiere ein 12 Stunden Tag- und Nachtzyklus eingehalten. Über die gesamte Versuchsperiode hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser ad libitum und zu Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland).

5.2. Modell

5.2.1. Mikrozirkulationsmodell der chronischen Rückenhautkammer

Als Modell verwendeten wir die leicht modifizierte Rückenhautkammer an der C57-BL6-Maus [Lehr, Leunig et al. 1993; Harder, Amon et al. 2004]. Diese Rückenhautkammer, welche quergestreifte Muskulatur, subkutan Gewebe und Cutis enthält, erlaubte am lebenden Versuchstier intravitalmikroskopische Untersuchungen über den Versuchszeitraum von 10 Tagen durchzuführen. Dabei konnten mittels Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie sämtliche Gefäße der Mikrozirkulation (Arteriolen, nutritive Kapillaren, etc.) dargestellt werden. Dies basierte auf der intravenösen Verabreichung unterschiedlicher Fluochrome, welche es ermöglichten das Fließverhalten der korpuskulären Blutbestandteile quantitativ zu beurteilen.

5.2.2. Anästhesie

Sämtliche Abläufe, die das Modell betrafen, d.h. sowohl die Rasur und vollständige Enthaarung mittels Plica Enthaarungscreme (Elcamed; Asid Banz GmbH, Herrenberg, Deutschland), die Präparation und auch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie an den einzelnen Versuchstagen wurden an narkotisierten Tieren durchgeführt. Mittels intraperitonealer Injektion eines Bolus von 0,1 ml Anästhesie pro 10 g Körpergewicht wurden die Tiere in Narkose gelegt. Diese bestand aus einem Gemisch aus insgesamt 90 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Parke Davis, Freiburg, Deutschland) sowie 25 mg/kg KG Dihydroxylidinothiazine-Hydrochlorid (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Im Mittel dauerte eine Narkose ca. 30-40 Minuten und gewährleistete Analgesie, Anästhesie sowie Muskelrelaxation. In einigen Fällen jedoch war aufgrund eines Nichtansprechens bzw. eines verzögerten Wirkeintritts der Narkose eine Nachinjektion erforderlich. Dabei dienten der noch vorhandene Tonus des Mäuseschwanzes sowie eine stark ausgeprägte Fluchtreaktion auf ein Kneifen in die Hinterpfote als Anhaltspunkt für eine nicht ausreichend tiefe Narkose. In diesen Fällen wurde den Tieren 0,1 ml Narkose nachinjiziert um eine ausreichende Analgesie und Anästhesie zu gewährleisten. Sämtliche Injektionen der Narkose tolerierten die Tiere problemlos.

5.2.3. Vorbehandlung

Im Rahmen der Versuchsreihe wurden insgesamt 2 Versuchsabschnitte zu je 4 Versuchsgruppen gebildet, welche unterschiedlich behandelt wurden. Bei jedem Versuchsabschnitt diente eine NaCl-behandelte Gruppe als Kontrollgruppe.

Versuchsabschnitt 1: Dieser zielte auf das Endothelinsystem und die durch die unterschiedlichen Endothelinrezeptoren vermittelten Prozesse ab. So erhielt im Rahmen dieses Versuchsabschnitts eine Behandlungsgruppe intraperitoneal den selektiven Endothelin-A-Rezeptorblocker BQ-123, der den Tieren in der Dosierung 1 mg/kg KG verabreicht wurde (n=6). Zur Blockade des Endothelin-B-Rezeptors wurden 7 weitere Tiere mit BQ-788 in der gleichen Dosierung ebenfalls intraperitoneal behandelt. Als letzte Behandlungsgruppe im zweiten Versuchsabschnitt diente ein kombinierter Endothelinrezeptor-Blocker. Hierzu bekamen 6 Tiere die Substanz PD-142893 intraperitoneal verabreicht. Diese injizierten wir den Tieren nach Lösen in 5 % DMSO mit einer Dosis von 0,5 mg/kg KG. Auch diesem Versuchsabschnitt ordneten wir eine NaCl-behandelte Kontrollgruppe mit insgesamt 7 Tieren zu. Innerhalb der unterschiedlichen Behandlungsgruppen verwendeten wir die im Folgenden genauer beschriebenen verschiedenen Konditionierungsschemata.

Versuchsabschnitt 2: Dieser setzte sich aus insgesamt 3 Behandlungsgruppen sowie einer zugehörigen Kontrollgruppe (n= 9) zusammen und nahm Bezug auf das Stickstoffmonoxid-System. Im Rahmen dieses Versuchsabschnitts erhielten daher insgesamt 14 Tiere die Aminosäure L-Arginin intraperitoneal verabreicht. Diese Substanz, welche als Substrat für die Stickstoffmonoxidsynthase dient wurde in 0,9 % NaCl gelöst und den Tieren in 2 unterschiedlichen Dosierungen verabreicht. Einmal mit 10 mg/kg KG (n=7) und einmal mit der doppelten Dosis von 20 mg/kg KG (n=7). Zur Blockade der oben genannten Stickstoffmonoxidsynthase erhielt die dritte Behandlungsgruppe des ersten Versuchsblocks die Substanz L-NAME (n=7), einen Inhibitor des Enzyms. Dieser Inhibitor wurde ebenfalls in 0,9 % NaCl gelöst und den Tieren in einer Dosis von 30 mg/kg KG verabreicht. Die Applikation erfolgte intravenös analog des Kontrastmittels in einen retrobulbär liegenden Venenplexus.

Im zweiten Versuchsabschnitt zur Beeinflussung der NO-Synthase erhielten die Tiere jeweils 30 Minuten vor Lappenhebung die jeweilige Substanz. L-Arginin wurde dann weiterhin täglich über die ersten 3 Tage des Versuchs intraperitoneal verabreicht. L-NAME dagegen wurden den Tieren intravenös gegeben und zwar ebenfalls 30 Minuten

vor Lappenhebung und anschließend zum Zeitpunkt der intravitalmikroskopischen Untersuchung, d.h. an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10. Analog zur Konditionierung mit L-Arginin verabreichten wir auch die Substanzen zur Blockade der unterschiedlichen Endothelinrezeptoren den Tieren intraperitoneal 30 Minuten präoperativ und über die ersten 3 Tage des Versuchs, d.h. täglich an den Tagen 1, 2 und 3. Die jeweiligen Kontrolltiere erhielten zum Flüssigkeitsausgleich jeweils das entsprechende Volumen an NaCl intraperitoneal (s. Abb. 5).

Lappenhebung		X							
Zeit	-30'	0	Tag 1	Tag 2	Tag 3		Tag 5	Tag 7	Tag 10
NaCl	X		X		X		X	X	X
L-Arginin, L-Arginin², BQ-123, BQ-788, PD-142893	X		X	X	X				
L-NAME	X		X		X		X	X	X

Abb. 5 : Schematische Darstellung über die unterschiedlichen Konditionierungsverfahren. Sämtliche Versuchsgruppen erhielten die entsprechende Substanz 30 Minuten vor der eigentlichen Lappenhebung. Anschließend erfolgte in der Behandlungsgruppe mit L-NAME eine intravenöse Gabe jeweils an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 (siehe untere Zeile). Die übrigen Versuchsgruppen dagegen erhielten die entsprechende Konditionierung ebenfalls 30 Minuten vor Beginn der Präparation und über die ersten 3 Tage unseres Versuchszeitraums, d.h. an den Tagen 1, 2 und 3 (siehe obere Zeile).

5.2.4. Farbstoffe

5.2.4.1. Fluoreszein-Isotiozyanat (FITC-Dextran 150.000)

Fluoreszein-Isotiozyanat (FITC-Dextran; Molekulargewicht 150.000 Da; Sigma Chemical Co.) ist ein Fluoreszenzfarbstoff (s. Abb. 6A), welcher über Thiocarbamid an Proteine gebunden wird und der Kontrastverstärkung in Blutgefäßen dient. Das Exzitationsmaximum dieser Substanz liegt bei 490 nm und die Emissionswellenlänge bei

520 nm. Die Metabolisierung und Elimination von Fluoreszein-Isothiozyanat erfolgt sowohl renal als auch hepatisch.

5.2.4.2. Rhodamin 6G

Rhodamin 6G (Sigma Chemical Co.), ein fluoreszierender Farbstoff (s. Abb. 6B), diente uns zur *In-vivo* Anfärbung von Leukozyten. Die Bindung von Rhodamin 6G erfolgte über Kernbindung, d.h. über Bindung der Substanz an Zytocrom-C von Leukozyten. Die fluoreszierende Eigenschaft von Rhodamin 6G ermöglichte so die Darstellung der Leukozyten. Die Emissionswellenlänge des Farbstoffs liegt bei 590 nm, das Exzitationsmaximum bei 530 nm. Sowohl Metabolisierung als auch Elimination von Rhodamin 6G erfolgen renal und hepatisch.

5.2.4.3. Bisbenzimid H 33342 (Hoechst®)

Bisbenzimid H 33342 (Hoechst®, Sigma Chemical Co.) ist ein Fluoreszenzfarbstoff (s. Abb. 6C), der an DNA bindet und mit dessen Hilfe sowohl Zellkerne als auch Chromatin an lebenden Zellen markiert werden können. Dadurch können sowohl unversehrte Kerne aber auch für die Apoptose typische Kernstrukturen wie beispielsweise Kondensation, Margination und Fragmentation mittels der oben genannten Kernfärbung dargestellt werden. Da Hoechst® spezifisch an zelluläre DNA bindet, war es möglich aufgrund der oben genannten typischen Kernstrukturen apoptotischer Zellen eine Auskunft Anzahl der apoptotischen Zellen zu erhalten.

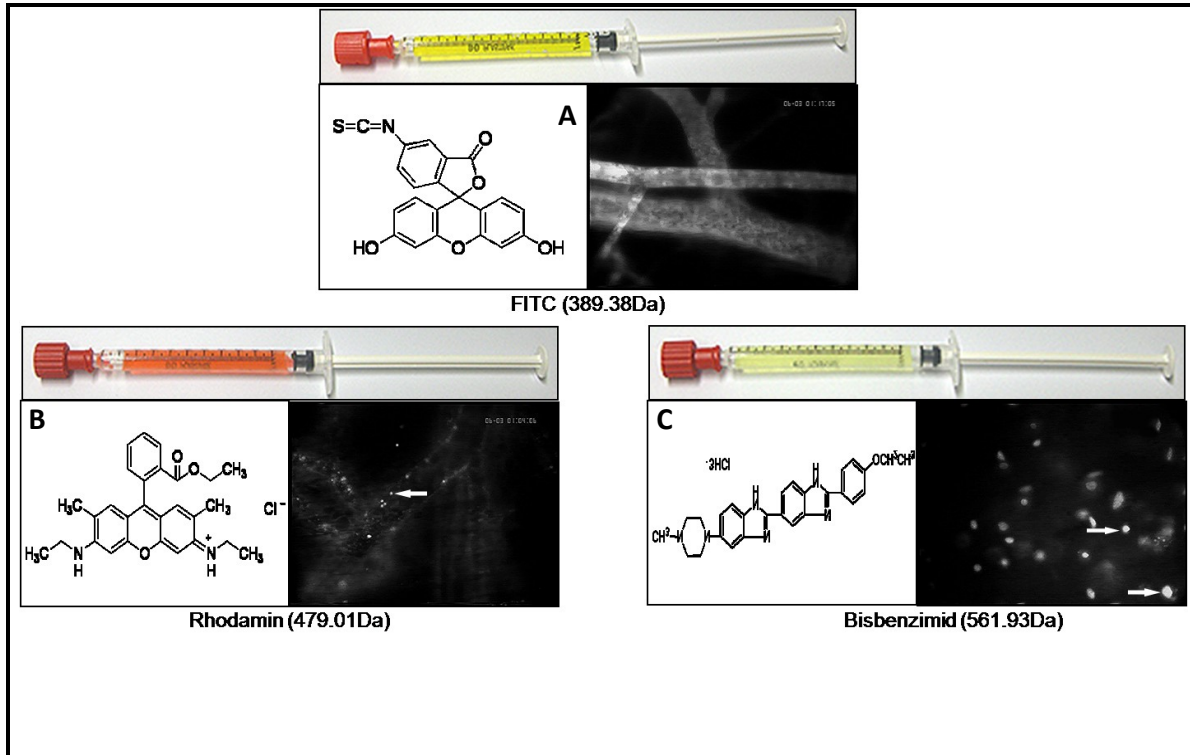


Abb. 6 : Übersicht über die von uns verwendeten Fluoreszenzmarker, welche in Verbindung mit den zugehörigen Filtern im IVM eine Darstellung sowohl von Mikrogefäßen (A) als auch von Leukozyten (B, Pfeil) und apoptotischen Zellen (C, Pfeile) ermöglichten.

5.2.4.4. Verschiedenene Substanzen zur Konditionierung

5.2.4.4.1. L-Arginin

L-Arginin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), eine Aminosäure, welche auch in der Nahrung vorkommt, dient als Substrat der Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase). Diese wiederum ist für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), einem sehr potenten Vasodilatator, verantwortlich. Nach seiner Entstehung führt NO G-Proteingekoppelt zu einer Abspaltung von cGMP und damit zu einer Relaxation der glatten Muskulatur. Insgesamt erhielten 14 Tiere L-Arginin in jeweils 2 unterschiedlichen Dosierungen intraperitoneal verabreicht.

5.2.4.4.2. L-NAME

L-NAME bzw. *N*_ω-Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) wurde als Inhibitor der NO-Synthase eingesetzt um die Produktion von NO zu

reduzieren und der dadurch vermittelten Vasodilatation entgegenzuwirken. Insgesamt erhielten 7 Tiere L-NAME. Dabei wurde die Substanz jeweils intravenös in einen retrobulbär gelegenen Venenplexus injiziert. Die Blockade der NO-Synthase sollte die Verfügbarkeit an freiem NO reduzieren und somit eine geringere Vasodilatation bewirken.

5.2.4.4.3. BQ-123

BQ-123 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), ein selektiver Antagonist des Endothelin-A-Rezeptors, wurde insgesamt 6 Tieren intraperitoneal verabreicht. Dabei sollte die über Endothelin-1 am Endothelin-A-Rezeptor vermittelte Gq-gekoppelte Vasokonstriktion verhindert werden und somit die Nekrose unseres willkürlich gebildeten Lappens reduziert werden.

5.2.4.4.4. BQ-788

BQ-788 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), ein selektiver Antagonist des Endothelin-B-Rezeptors, wurde ebenfalls 7 Tieren intraperitoneal verabreicht. Dabei sollte primär der über Endothelin-1 an diesem Rezeptor vermittelte Mechanismus der Vasokonstriktion blockiert werden.

5.2.4.4.5. PD-142893

PD-142893 (Axxora Deutschland GmbH, Lörrach, Germany), ein kombinierter Antagonist, der sowohl den Endothelin-A-Rezeptor als auch den Endothelin-B-Rezeptor blockiert, wurde 6 Tieren intraperitoneal verabreicht. Dadurch sollte einer Endothelin-1-vermittelten Vasokonstriktion entgegengewirkt werden, um dadurch eine verbesserte Durchblutung unserer Lappenplastik zu gewährleisten.

5.2.5. „Random pattern flap“

Der „random pattern flap“ gehört im Gegensatz zu den axialen Lappen zu den willkürlich durchbluteten Lappenplastiken. Auf Grund seiner subkoralen Versorgung durch kapillare Gefäße eines subdermalen Gefäßplexus, der in der Subkutis verläuft und ubiquitär vorhanden ist, obliegt er strengen geometrischen Regeln. Die randomisierte Verteilung dieser Kapillaren bestimmt die Größe des randomisiert durchbluteten Lappen, da sie in der Lappenbasis lokalisiert und für die adäquate Durchblutung verantwortlich sind. Dementsprechend müssen bestimmte Verhältnisse zwischen der Breite der Lappenbasis und der Lappenlänge respektiert werden. Ein Ignorieren dieser Verhältnisse hätte aufgrund mangelnder Perfusion ein Absterben des Lappens zur Folge. Normalerweise beträgt dieses Länge-zu-Breite-Verhältnis an den Extremitäten sowie am Körperstamm 2:1 (s. Abb. 7). Es kann aber auch an gut durchbluteten Körperregionen wie beispielsweise der Gesichtshaut 3:1 betragen.

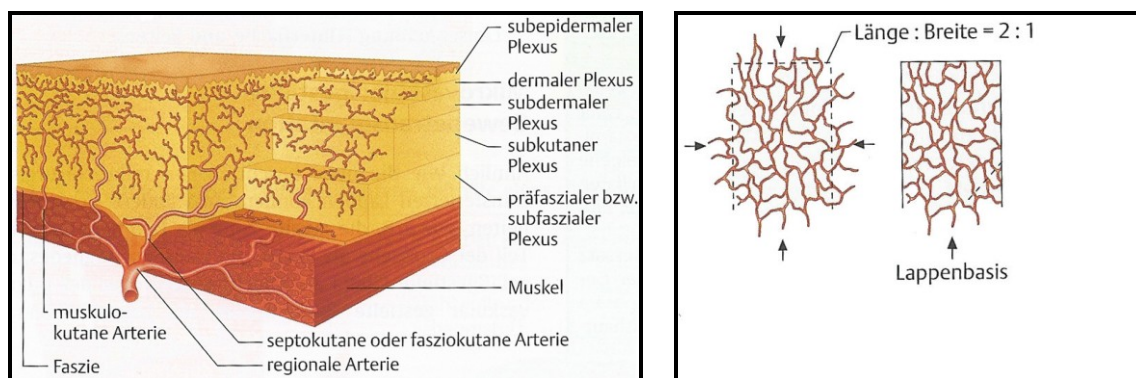


Abb. 7: Schematische Darstellung der Durchblutung der verschiedenen Gewebeschichten (linkes Bild): Die Blutversorgung eines willkürlich gebildeten Lappens erfolgt über den subdermalen Gefäßplexus. Das rechte Bild zeigt das Durchblutungsmuster eines randomisierten muskulokutanen Lappens, in dem das Lappenüberleben stark von der Breite der Lappenbasis abhängig ist [A. Hirner 2008].

5.2.6. Chirurgischer Eingriff und Lappenpräparation

Über die gesamte Versuchsdauer von 10 Tagen wurde bei allen Behandlungs- und NaCl-behandelten Kontrollgruppen eine einheitliche Präparation angewendet. Es wurde ein sogenannter „Random pattern flap“ gehoben. Bereits vor der Präparation entfernten wir Fell und Haare vom Rücken der Tiere. Die Rasur der Tiere erfolgte stets einen Tag vor der eigentlichen Lappenhebung und ebenfalls unter Narkose. Die Rasur der Tiere erfolgte zunächst mit Hilfe eines Elektrorasierers (Elektra II, Bullacher Ag, Homburg) und anschließend mittels Plicamed®-Enthaarungscreme (Asid Banz GmbH, Herrenberg,

Deutschland) zur Entfernung der restlichen Haare. Die Enthaarungscreme wurde den Tieren insgesamt zweimal für ca. 10 Minuten aufgetragen und im Anschluss mit lauwarmem Wasser abgespült. Da es den Tieren nur schwer möglich war, im Rahmen der Aufwachphase zu trinken, wurde ihr Flüssigkeitsverlust im Rahmen ihrer Narkose mittels der Injektion von 0,3 ml NaCl ausgeglichen. Außerdem wurden sie zum Schutz vor Auskühlung bis zum Aufwachen vor eine Rotlichtlampe platziert.

Die Präparation des Lappens stellt ein etwas modifiziertes Kammermodell dar. Unter Mitnahme des Panniculus Carnosus wurde ein senkrecht zur Wirbelsäule der Tiere liegender „random pattern flap“ gehoben (Länge 11 mm, Breite 15 mm).

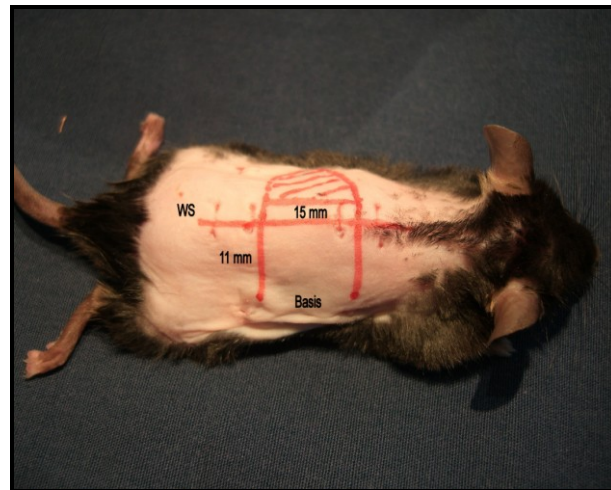


Abb. 8 : Schematische Darstellung über die Größe des „random pattern flap“. Entlang der Wirbelsäule (WS) wurde ein Hautlappen mit einer Länge von 11mm und einer Breite von ca. 15mm gehoben.

Um das Risiko von Infektionen und Eiterbildung in der zu untersuchenden Kammer möglichst gering zu halten, wurde der Rücken der Tiere vor Beginn der Präparation mit Softasept desinfiziert. Bei der Präparation positionierten wir die Tiere nach erfolgter intraperitonealer Anästhesie zuerst vor einer Kaltlichtlampe. Dann wurde unter Gegenlicht kontrolliert, ob die von rechts und links zuführenden Gefäße, welche Ästen der tiefen arteria circumflexa iliaca (deep circumflex iliac artery, DCIA) und der arteria thoracica lateralis (lateral thoracic artery, LTA) entsprachen, parallel verliefen. Durch 2 Haltenähte, welche ungefähr 2-3 mm rechts und links dieser Gefäße angebracht wurden, wurde die Maus an einem Metallbalken fixiert.

Nun wurde der dem Lappen zugewandte Teil des Titanrahmens der Kammer vorübergehend an dieser doppellagigen Hautfalte platziert. Zur Fixierung dienten auch

hier Haltenähte. Mit Hilfe von 2 Schrauben, die zuvor an dem Titanrahmen befestigt wurden und nun als Orientierung dienten, wurde unter Verwendung einer gebogenen Schere die Hautschicht perforiert. Später sollten diese Löcher zur Fixierung des Titanrahmens dienen.

Anschließend konnte die Maus wieder von dem Metallbalken entfernt und der fixierte Titanrahmen konnte abgelöst werden. Nach erneutem horizontalem Positionieren der Maus wurde mit einem Permanentmarker (Edding, Germany) die Begrenzung des Lappens in einem Abstand von ca. 2 mm zur kontralateralen Seite eingezeichnet (15 mm * 11 mm). Auch am distalen Ende der Hautfalte wurde mit ca. 2 mm Abstand zur Gegenseite eine Kennzeichnung vorgenommen, die später durch einen Halbkreis ergänzt wurde (s. Abb. 8). Dieses Gewebe sollte im späteren Verlauf als Material zur Gewinnung histologischer Proben dienen.

Anschließend erfolgte die Lappenhebung, wobei durch vertikale Inzision der seitlichen Lappenschenkel sowohl ein Ast der tiefen arteria circumflexa iliaca als auch ein Ast der seitlichen arteria thoracica durchtrennt und somit die lateral zuführende Blutversorgung unterbrochen wurde. Somit war die Durchblutung des Lappens ausschließlich über die in der Basis zuführenden Gefäße gewährleistet (s. Abb. 9 B).

Anschließend wurde die verbleibende Hautschicht (aus Epidermis, subkutanem Fettgewebe und Muskel) erneut mittels Haltenähten an der Rückseite des Titanrahmens fixiert (s. Abb. 9 C). Auch die links und rechts verbliebenen Hautfalten wurden wieder an den Titanrahmen fixiert. Im darauffolgenden Schritt wurden die lateralen Seiten des Lappens unter ständiger Befeuchtung durch 0,9 % NaCl-Lösung mittels je ca. 3 Einzelknopfnähten mit nicht resorbierbarem 6-0 Prolene Faden (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Germany) wieder an die umgebende Haut zurückgenäht (s. Abb. 9 D), um Adhäsion zu verhindern und einen sicheren Verschluss der Kammer zu gewährleisten. Der ganze Eingriff wurde unter einem Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) vorgenommen (Vergrößerung 8x-16x). Um eine direkte Sicht auf Muskel- und Hautgewebe zu gewährleisten erfolgte eine mikrochirurgische Entfernung des „lose areolar tissue“ auf einer Fläche von ca. 90 mm².

Anschließend wurde der zweite Teil des Titanrahmens als Gegenstück zum ersten verankert und durch das offene Beobachtungsfenster ein Tropfen Bisbenzimid H33342 (Hoechst; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) auf die freiliegende Rückseite der Haut gegeben. Ziel war es dadurch zu verhindern, bei jeder Mikroskopie das Deckglas zu entfernen und somit eine mechanisch bedingte Entzündung des Gewebes zu induzieren. Nach einer relativ kurzen Einwirkzeit von wenigen Minuten wurde das überschüssige nicht aufgenommene Hoechst mittels 0,9 % NaCl abgespült und das Beobachtungsfenster durch ein Deckglas luftdicht versiegelt und mittels Sprengring befestigt (s. Abb. 9E). Die

zu untersuchende Haut (Muskel und Dermis) fand lediglich durch Adhäsionskräfte Kontakt zum Deckglas. Bis zu ihrem Erwachen lagerten wir die Tiere vor einer Rotlichtlampe (Philips, Eindhoven, Niederlande) um ein Auskühlen zu verhindern. Insgesamt tolerierten die Tiere sowohl die Präparation als auch das Tragen der Rückenhautkammer (mit einem Gewicht von ca. 3g) gut, was sich an unveränderten Schlaf- und Essgewohnheiten zeigte.

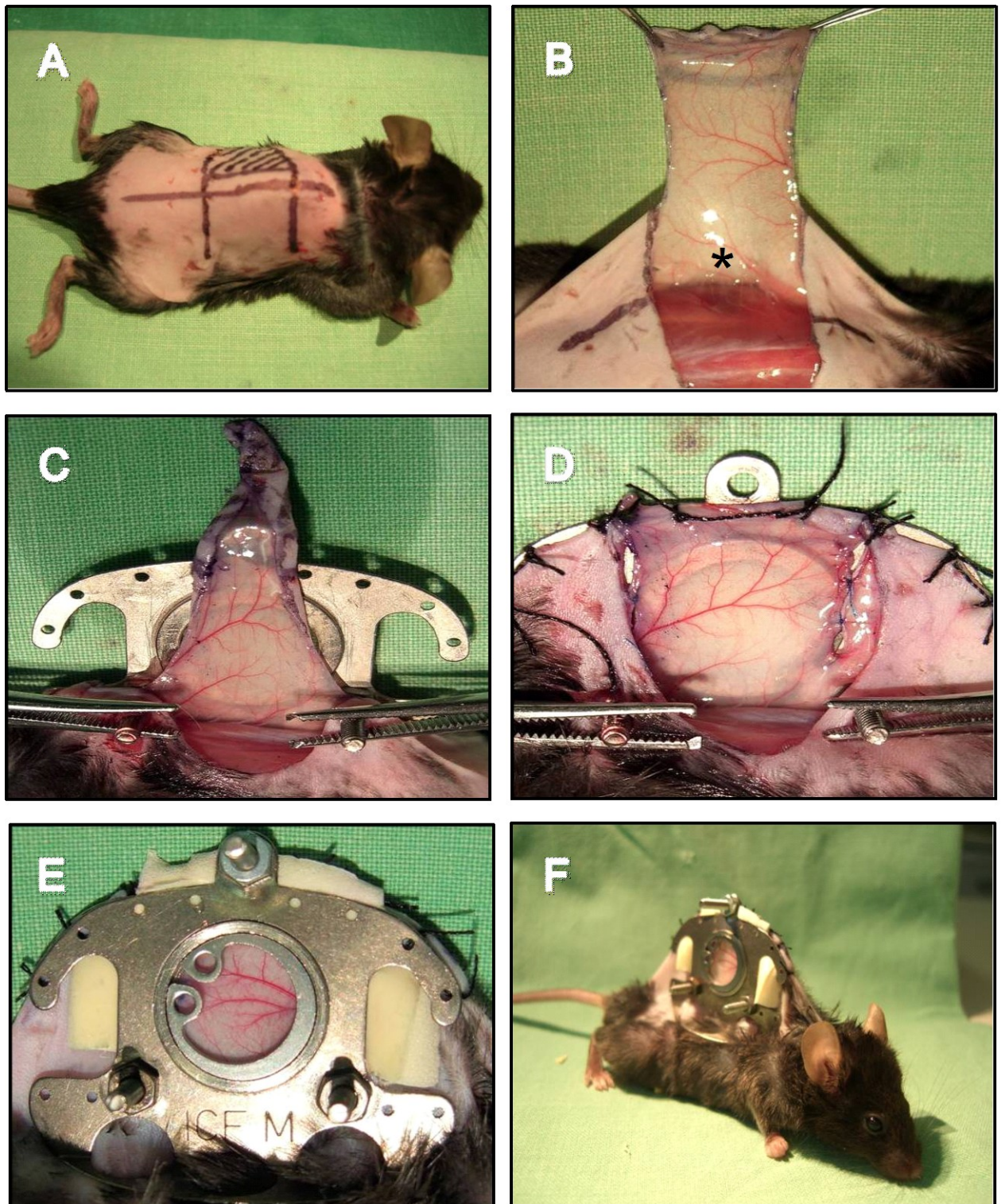


Abb. 9 : Schrittweise Darstellung der Präparation der Rückenhautkammer mit „random pattern flap“: (A) Einzeichnen des Lappens auf der Rückenhaut (Breite: 15mm, Länge: 11 mm) mit einer Extension von 2 mm zur kontralateralen Seite. Um die Rückseite des Lappengewebes zu untersuchen, wurde überschüssiges Gewebe entfernt (schraffierte Fläche). (B) Hebung des lateral gestielten Hautlappens mit einer randomisierten Gefäßversorgung an der Basis (*). (C) Platzierung des Lappens auf der Rückseite der Titankammer und (D) Wiedereinnähen in die Rückenhaut, um Adhäsion und Dichtigkeit zu garantieren. (E) Vollständig montierte Kammer nach der Präparation inkl. Deckglas und Schaumstoff sowohl seitlich als auch an der Spitze der Titankammer. (F) Maus nach Lappenhebung mit Rückenhautkammer

5.2.7. Versuchsprotokoll

Insgesamt wurden für unseren Versuch 55 C57BL/6J Mäuse verwendet, d.h. sowohl zur Operation als auch zur Mikroskopie. Die Einteilung erfolgte in 8 Versuchsgruppen:

1. Sham mit NaCl-behandelten Lappen; n=7
2. L-Arginin; n=7; 10 mg/kg KG
3. L-Arginin in doppelter Dosis (=L-Arginin²); n=7; 20 mg/kg KG
4. L-NAME; n=7; 30 mg/kg KG
5. Sham mit NaCl-behandelten Lappen; n=7
6. BQ123 (= ETA-Rezeptorblockade); n=6; 1 mg/kg KG
7. BQ788 (=ETB-Rezeptorblockade); n=7; 1 mg/kg KG
8. PD142893 (=ETAB-Rezeptorblockade); n=7; 0,5 mg/kg KG

Die wiederholte intravitalmikroskopische Untersuchung der Tiere erfolgte erstmals 24 Stunden nach Lappenhebung sowie an den Tagen 3, 5, 7 und 10 unseres Versuchs (s. Abb.10). Wir verwendeten dazu ein Axiotech Intravitalfluoreszenzmikroskop (IVM) der Firma Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Germany). Nach der letzten Mikroskopie am 10. Tag wurden alle Tiere mit einer Überdosis an Anästhetikum euthanasiert.

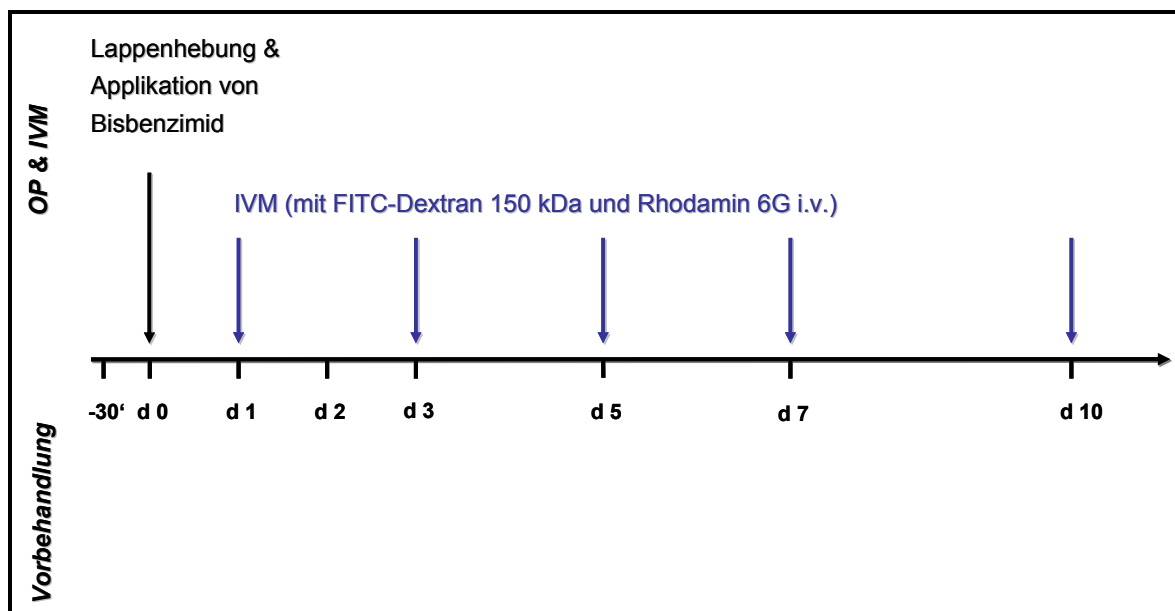


Abb. 10 : Experimentelles Protokoll: Die Lappenhebung erfolgte an d0, gefolgt von wiederholten intravitalmikroskopischen Untersuchungen an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10. Eine Konditionierung mit den jeweiligen Behandlungssubstanzen erfolgte 30 Minuten vor Lappenhebung und Intravitalmikroskopie nach den oben dargestellten Konditionierungsschemata.

5.3. Untersuchungsmethoden

5.3.1. Mikrozirkulation

5.3.1.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und Farbstoffe

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen (IVM) wurden bei konstanter Raumtemperatur von ~ 23°C durchgeführt. Zur IVM diente dabei ein Axiotech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany), welches mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampf-Lampe ausgestattet war und durch einen Filter zur Aufsichtbeleuchtung installiert war. Dementsprechend konnten je nach Bedarf verschiedene Filter in das Strahlengangsystem eingebracht werden (s. Abb. 11). Verwendet wurden ein Filter für blaues (Anregungswellenlänge: 450-490 nm, Emissionswellenlänge: >520 nm), für grünes (Anregungswellenlänge: 530-560 nm; Emissionswellenlänge: >580 nm) und für ultraviolettes Licht (Anregungswellenlänge: 330-390 nm, Emissionswellenlänge >430 nm). Als Fluoreszenzfarbstoffe kamen 5 % Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)-Dextran mit einem Molekulargewicht von 150.000 Da (Sigma Chemical Co.), 1 % Rhodamine 6G (Sigma Chemical Co.) sowie Bisbenzimid (Hoechst, Sigma Chemical Co.) zum Einsatz. Die jeweiligen in vivo Aufnahmen wurden von einer hochempfindlichen CCD (charged coupled device)-Videokamera (FK 6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und über einen Bildschirm (PVM 1371 – QM, Sony Corp. Tokio, Japan) an einen VHS-Videorekorder (Panasonic, AG 7350-SVHS; Mitsushita, Tokyo, Japan) übermittelt (s. Abb.12). Ein zwischen Bildschirm und Videokamera geschalteter Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan) ermöglichte es parallel zur Aufnahme eine entsprechende Gruppen- sowie Tiernummer zu definieren und einzublenden. Außerdem war es möglich die abgelaufene Versuchszeit in Minuten und Sekunden zu registrieren. Im Rahmen der IVM wurden stets die gleichen Objektive verwendet. Dazu gehörten ein 5x Objektiv der Firma ZEISS (ZEISS, Jena, Germany) für Übersichtsaufnahmen und die systematische Darstellung der nekrotischen Gewebefläche. Detailliertere Aufnahmen erfolgten jeweils mit einem 20x und einem 40x Wasserimmersionsobjektiv (ZEISS, Axioplan W 20x/0,5 und W 40x/0,75, ZEISS, Jena, Germany). Die Auswertung des apoptotischen Zelltodes erfolgte mit Hilfe eines 63x Wasser-Immersionsobjektiv (ZEISS, Jena, Germany). Jede IVM erfolgte nach dem gleichen Schema. Nach dem Narkotisieren des Tieres erfolgte zu Beginn einer jeden IVM zur Kontrastverstärkung die Injektion von

jeweils 0,05 ml Rhodamine 6G und 0,05 ml FITC-Dextran intravenös. Dazu wurde den Mäusen das Kontrastmittel in einen retrobulbär liegenden Venenplexus verabreicht. Lediglich Bisbenzimid konnte den Tieren nicht erneut injiziert werden, da hierzu eine lokale Verabreichung notwendig gewesen wäre. Daher bekamen die Tiere letzteren Farbstoff lediglich im Rahmen der Präparation verabreicht, um eine Schädigung des zu untersuchenden Lappengewebes zu verhindern.

Nach Injektion der Farbstoffe wurde das narkotisierte Tier in lateraler dekubitaler Position auf einer Plexiglasplatte fixiert, um eine möglichst plane Lage der Kammer zu gewährleisten. Abhängig von der Perfusion des jeweiligen Gewebes beanspruchte die Mikroskopie im Durchschnitt 20 min.

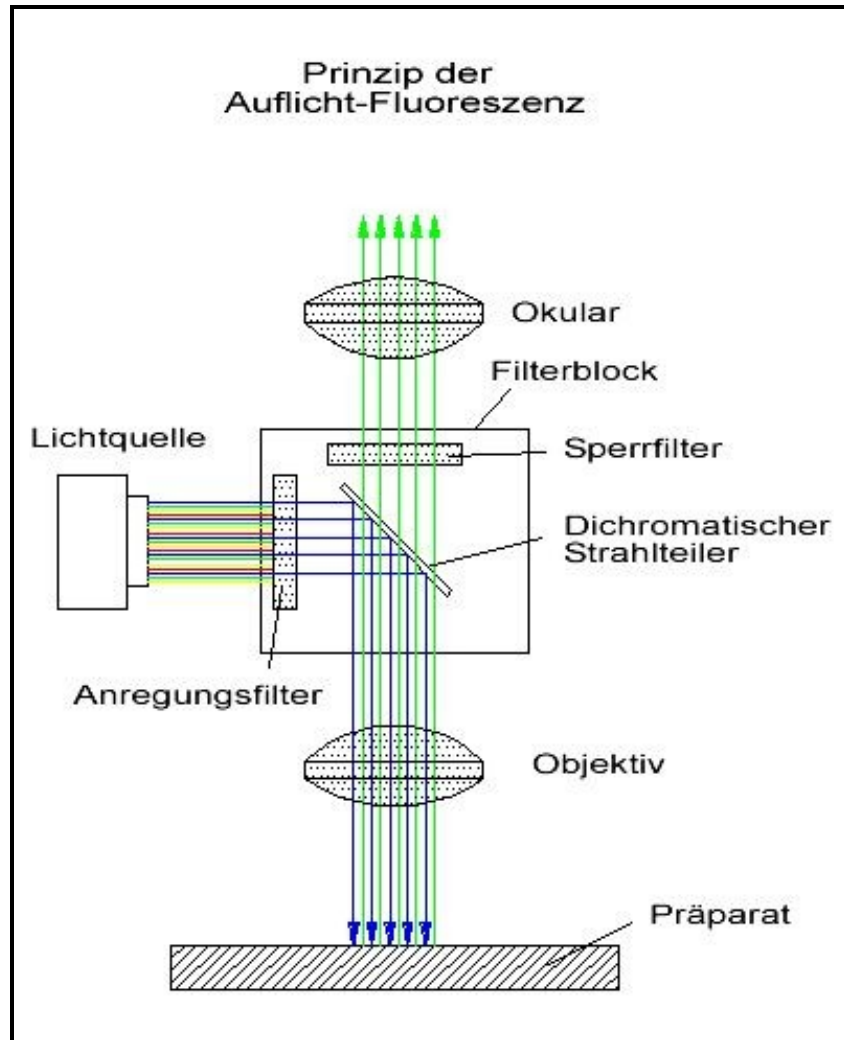


Abb. 11 : Der **Anregungsfilter** wählt aus dem gesamten Wellenspektrum, welches die Lampe ermöglicht, den Bereich aus, der benötigt wird, den ausgewählten Fluoreszenzfarbstoff anzuregen. Mittels des dichromatischen Teilerspiegels wird das Anregungslicht möglichst vollständig zum Präparat hin reflektiert, wobei das Fluoreszenzlicht vollständig durchgelassen werden soll. Dieser Teilerspiegel, der auch als Reflexions-Kurzpassefilter bezeichnet wird, ist in der Lage bestimmte Bereiche eines Spektrums vollständig reflektieren und andere durchzulassen. Daher ist es möglich, Anregungs- und Emissionslicht exakt voneinander zu trennen. Der **Sperrfilter** ist in den Abbildungsstrahlengang eingebracht und lässt lediglich die Wellenlängen durch, die für das ausgewählte Fluorochrom spezifisch sind. Dies hat zur Folge, dass jedes andere Fluoreszenzlicht oder das vom Präparat reflektierte Licht vom Beobachter ferngehalten wird. Um optimale Ergebnisse zu garantieren, ist es erforderlich, dass alle drei vorhandenen Filter exakt aufeinander abgestimmt sind. Quelle: <http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz>.

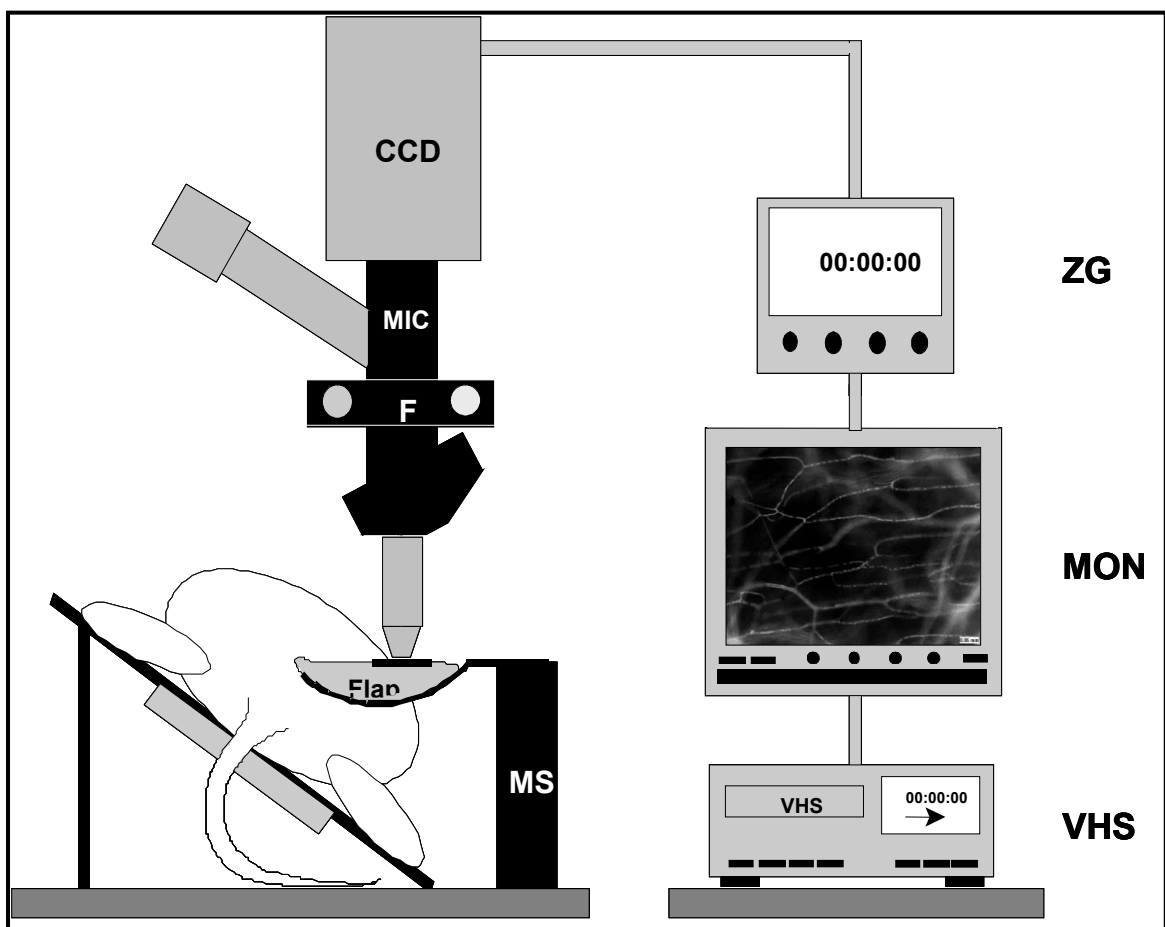


Abb. 12 : Versuchsaufbau des Intravitalmikroskops: Die Maus wurde in lateraler, dekubitaler Position auf einer standardisierten Plexiglasbühne befestigt, um eine möglichst horizontal ausgerichtete Oberfläche zu garantieren. Die Mikroskopie (MIC) erfolgte unter Verwendung verschiedener Filterblöcke (F). Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wurde mittels einer „low light“ CCD-Kamera (FK 6990B-IQ, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego CA, USA) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgenommen. Diese CCD-Kamera war über einen Videozeitgenerator (ZG) mit einem Monitor verbunden (MON). Letzterer war an einen Videorekorder (VHS) angeschlossen, der zur Fertigung der Aufnahmen diente, welche später offline ausgewertet wurden.

5.3.1.2. Ablauf der intravitalmikroskopischen Untersuchung

Jede Mikroskopie wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, d.h. bei einer konstanten Raumtemperatur von ca. 23° Celsius und nach intravenöser Verabreichung der Fluoreszenzfarbstoffe. Das zu mikroskopierende kreisrunde Areal teilten wir in 3 gleichgroße Abschnitte, einen proximalen, einen zentralen sowie einen distalen Abschnitt. Am Anfang jeder Mikroskopie wurde das Gewebe, welches durch die Kammeröffnung sichtbar war immer systematisch mit dem 5x Objektiv abgefahren und auf VHS aufgenommen. Dabei verwendeten wir den Filter für blaues Licht. Dadurch konnte zwischen perfundiertem und nicht perfundiertem bzw. nekrotischem Gewebeanteil differenziert werden. Anschließend wurden Arteriolen der 2. bzw. 3. Generation und die dazugehörigen Venulen mit relativ leicht wiederzuerkennendem Verzweigungsmuster jeweils im proximalen, zentralen und distalen Anteil der Kammer aufgesucht. Diese wurden dann unter Verwendung des 20x Objektivs aufgenommen und je 1 Videoausdruck angefertigt. Letzterer sollte dazu dienen, die Gefäßbündel über den Versuchszeitraum von 10 Tagen an den jeweiligen Zeitpunkten der Intravitalmikroskopie eindeutig wiederzuerkennen. Die Aufnahmen dieser Gefäßbündel ermöglichten die Messung der Gefäßdurchmesser und der zellulären Fließgeschwindigkeit des Blutes. Im Anschluss an die Aufnahmen der Gefäßbündel wurden pro Lappenanteil zufällig je 3 Kapillarfelder mit Hilfe des 20x Objektivs für jeweils 30 Sekunden aufgenommen. Diese Kapillarfelder dienten im Verlauf zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte, welche ein objektives Maß für die nutritive Perfusion des Lappens darstellt [Menger and Vollmar 1994], der kapillaren Durchmesser und der kapillaren Fließgeschwindigkeit. Aus Durchmesser und Fließgeschwindigkeit errechnete sich der volumetrische Blutfluss für Arteriolen, Venulen und Kapillaren (s. 5.3.2.5.). Abschließend wurde im ultravioletten Farbfilter mit Hilfe des DNA-bindenden Farbstoffs Hoechst und dem 63x-Wasserimmersionsobjektiv der apoptotische Zelltod aufgenommen. Dabei wurden die charakteristischen Zeichen des apoptotischen Zelltods wie z.B. Kondensation, Fragmentation und Margination sichtbar gemacht. Auch hier wurden jeweils pro Lappenanteil 3 zufällige Felder ausgewählt, durchfokussiert und aufgenommen.

Die Analyse der aufgenommenen Parameter erfolgte später offline mittels eines computergestützten Bild-Analysesystems (CapImage; Zeintl Software, Heidelberg, Germany).

5.3.2. Mikrozirkulatorische Parameter

5.3.2.1. Fläche

Die mikrozirkulatorische Analyse beinhaltete unter anderem die **nekrotische Gewebefläche in %** der Gesamtlappenfläche. Dabei erfolgte offline mittels Umrandung die Markierung des erfassten perfundierten Gewebes. Sämtliche perfundierte Areale wurden addiert und anschließend von der Gesamtfläche (89 mm²) subtrahiert. Entsprechend ergaben sich die durchschnittlich perfundierte Gewebefläche sowie die entsprechende Lappennekrose.

5.3.2.2. Funktionelle Kapillardichte

Die **funktionelle Kapillardichte**, welche ein objektives Maß für die nutritive Perfusion des Lappens darstellt, berechnete sich als Kapillarlänge pro Fläche. Dabei wurden nur die mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren berücksichtigt. Kapillaren, die ausschließlich Blutplasma enthielten oder aber nicht perfundiert waren, wurden ausgeschlossen. Die Kapillaren wurden ihrer Länge nach ausgemessen. Pro Lappenanteil, d.h. proximal, zentral und distal, wählten wir nach dem Zufallsprinzip je 3 Felder aus. Die ausgewählten, perfundierten Kapillaren wurden im Anschluss während der laufenden Aufnahmesequenz markiert. Aus diesen markierten Kapillaren errechnete der Computer nun die Gesamtlänge pro Gesichtsfeld und somit die funktionelle Dichte der Kapillaren in cm/cm².

5.3.2.3. Durchmesser

Der **Durchmesser** von Arteriolen, Kapillaren und Venulen wurde mittels wiederholter Ausmessung zweier gegenüberliegender Punkte an der perfundierten Gefäßwand bestimmt. Diese wurden 8-10mal nacheinander durch eine senkrecht zum Gefäßverlauf liegende Strecke verbunden. Diese Messung fand stets am stehenden Videobild statt. Letztlich bildeten wir aus den einzelnen Durchmessern das arithmetische Mittel, welches im Computer erfasst wurde.

5.3.2.4. Blutzellgeschwindigkeit

Zur Erfassung der **Erythrozytenfließgeschwindigkeit (Red blood cell velocity, RCBV)** bedienten wir uns der sogenannten „line shift“-Methode [Klyscz, Junger et al. 1997]. Nach Positionierung mehrerer möglich zentral im Gefäßlumen gelegenen Messlinien entlang der Flussrichtung wurde das Videoband für ca. 10 Sekunden abgespielt. Der Computer erstellte dabei für jedes Halbbild entlang der Messlinien ein Grauwertprofil und speicherte dies in einem Bildspeicher. Aus den aneinander gereihten Grauwertprofilen erzeugte der Computer anschließend das sogenannte Line-Shift-Diagramm. Die Steigung der Linien dieses Diagramms entspricht der Blutzellgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$.

5.3.2.5. Mikrovaskulärer Blutfluss

Aus den oben erhobenen Daten von Gefäßdurchmesser und Fließgeschwindigkeit errechnete sich basierend auf der Gleichung nach Gross und Aroesty ($Q = V \cdot \pi \cdot r^2$), welche auf eine zylindrische Gefäßform zurückgeht [Gross and Aroesty 1972], der **arterioläre, kapillare bzw. venuläre Blutfluss in pl/s** .

5.3.2.6. Apoptotischer Zelltod

Die Auswertung des **apoptotischen Zelltods** in n/mm^2 erfolgte mittels Auszählung in einem definierten Beobachtungsfeld und anschließender Erfassung auf dem Computer. Dabei dienten die charakteristischen Eigenschaften des programmierten Zelltodes, wie z.B. die Kondensation und Fragmentation des nukleären Chromatins, zur Identifizierung der apoptotischen Zellen. Diese erscheinen durch den DNA-Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid als intensiv hellleuchtende Punkte [Westermann, Vollmar et al. 1999].

Übersicht über die erhobenen Parameter:

Messparameter	Einheit
Nekrose	% der Gesamtfläche
Funktionelle Kapillardichte	cm/cm ²
DurchmesserArteriolen/Venulen/Kapillaren	µm
Blutzellgeschwindigkeit	mm/s
Volumetrischer Blutfluss	pl/s
Apoptotischer Zelltod	n/mm ²

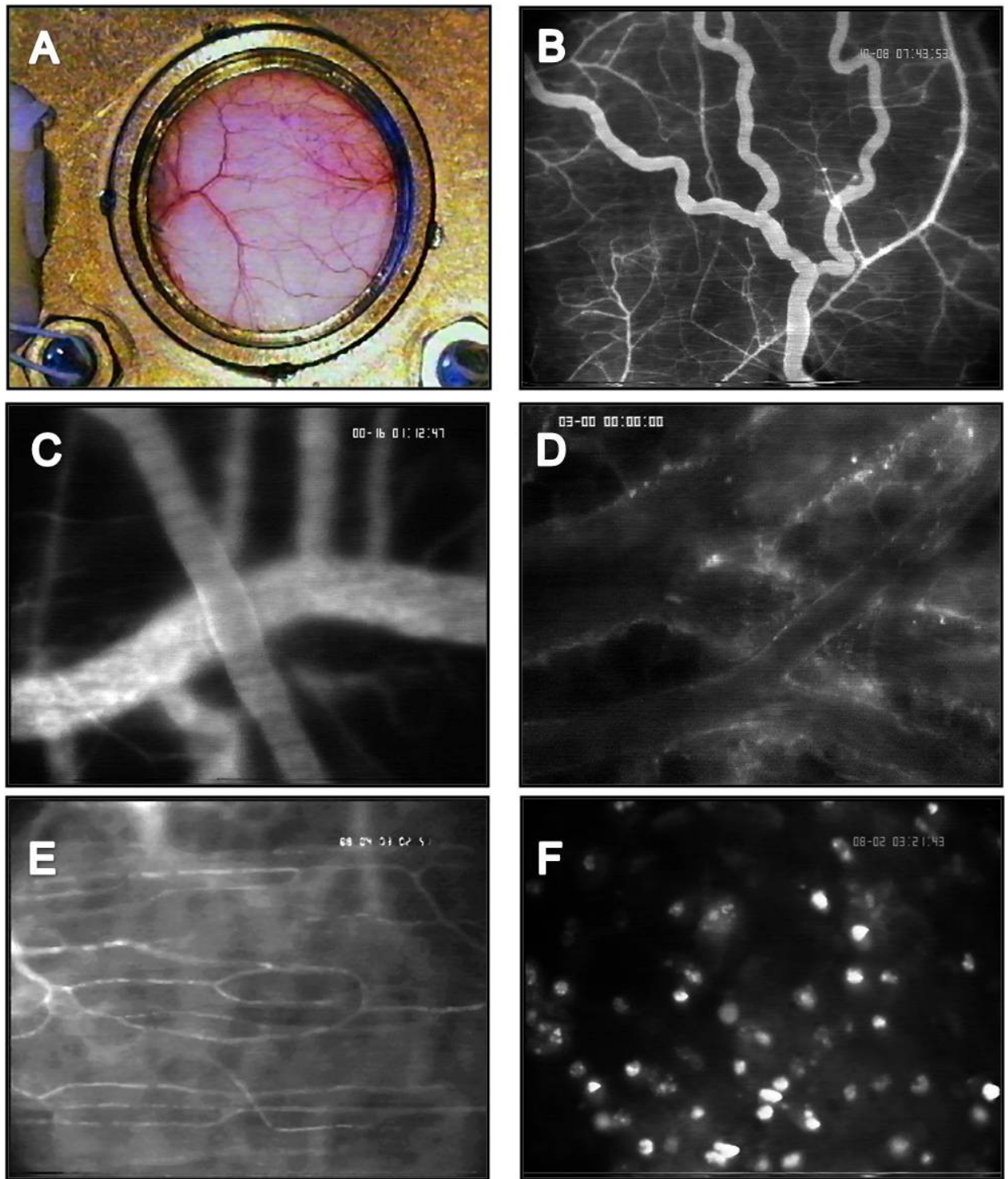


Abb. 13 : Übersicht über die unterschiedlichen Aufnahmen, die gemacht wurden um die verschiedenen Parameter auszuwerten. Eine Übersichtsaufnahme zur Darstellung der durchbluteten Fläche und damit der nekrotischen Gewebefläche (A+B), arteriovenöses Bündel in der 20fachen Vergrößerung zur Auswertung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit, des arteriolären und venösen Durchmessers und des Blutflusses (C), exemplarisch arteriovenöses Bündel im Rhodaminfilter zur Darstellung der rollenden und haftenden Leukozyten in der 20fachen Vergrößerung (D), Kapillarfeld in der 20fachen Vergrößerung zur Auswertung der funktionellen Kapillardichte, Durchmesser, Fließgeschwindigkeit und Blutfluss in den Kapillaren (E), Darstellung des apoptotischen Zelltods mit Hilfe des 63x Immersionsobjektives (F).

5.4. Statistik

5.4.1. Datenauswertung

Zur Auswertung der auf Video festgehaltenen Daten verwendeten wir eine Computer-gestützte Auswertungseinheit mit dem Software-Programm Cap Image (Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) [Klyscz, Junger et al. 1997]. Dabei werden die aufgenommenen Bilder über einen analogen oder einen digitalen Framegrabber eingelesen und anschließend mit der Software ausgewertet, was eine von der Mikroskopie zeitlich unabhängige Auswertung ermöglicht.

5.4.2. Datenerfassung

Auf dafür eigens angefertigten Erfassungsbögen erfolgte sowohl während der Intravitalmikroskopie als auch während der offline Videoauswertung am CAP-Image-System die Datenerfassung. Anschließend wurden die Daten in Exceltabellen übertragen und mittels Microsoft- Excel- Software in digitaler Form auf Computer gespeichert. Sämtliche Werte wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben.

5.4.3. Statistische Bearbeitung

Zur Berechnung sämtlicher statistischer Signifikanzen wurde das Programm Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet. Bei vorliegender Normalverteilung der untersuchten Gruppen erfolgte der Vergleich zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen an den Versuchstagen mittels „one way analysis of variance for multiple comparisons“ (ANOVA). Als post-hoc-Test kam der Student-Newman-Keuls-Test zum Einsatz und ein p-Wert von $<0,05$ wurde als Signifikanzniveau definiert.

5.4.4. Graphische Darstellung

Die graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Alle Darstellungen der Daten erfolgten stets als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM).

6. Ergebnisse

6.1. Endothelin-Rezeptorblockade

6.1.1. Nekrotische Gewebefläche

Der mikrovaskuläre Perfusionsausfall bzw. die nekrotische Gewebefläche, angegeben in % der Gesamtlappenfläche, nahm über den Versuchszeitraum von 10 Tagen sowohl in der unbehandelten Kontrollgruppe als auch in den mit ETA- bzw. ETAB-Rezeptorblockern behandelten Tieren zu. Im Gegensatz dazu zeigte lediglich die selektive Endothelin-B-Rezeptorblockade bereits am 1. Tag einen geringeren Perfusionsausfall, der sich trotz anhaltender mikrozirkulatorischer Störung im Verlauf noch weiter reduzierte, um an Tag 10 des Versuchs gegenüber den anderen Gruppen signifikant geringer zu sein (s. Abb.14).

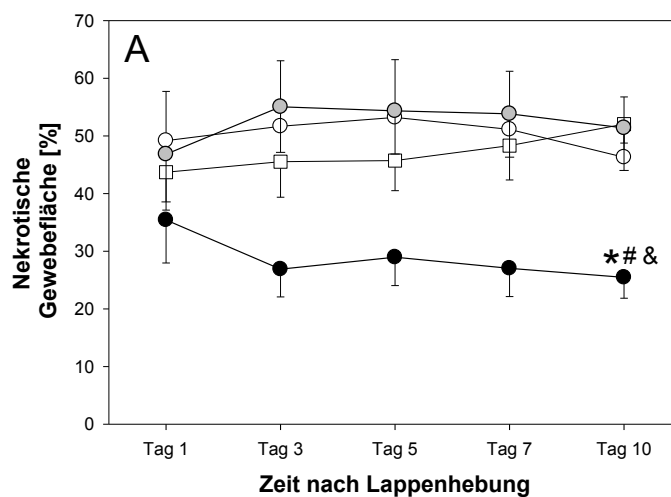


Abb. 14 : Perfusionsausfall bzw. nekrotische Gewebefläche (in %) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate). Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, & $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

6.1.2. Arteriöläre Fließgeschwindigkeit

Die arteriöläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit im proximalen Lappenareal (s. Abb. 15A) zeigte innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen keine wesentlichen Unterschiede. In dem normal durchbluteten proximalen Lappenareal kam es über die 10 Tage zu keiner wesentlichen Veränderung der Fließgeschwindigkeit.

Im zentralen Areal dagegen beobachteten wir nach Gabe des selektiven ETB-Rezeptorblockers (s. Abb. 15B) bereits initial eine höhere Fließgeschwindigkeit gegenüber den übrigen 2 Behandlungsgruppen. Diese Tendenz konnte über die 10 Versuchstage aufrechterhalten werden.

Insbesondere im distalen Areal (s. Abb. 15C) zeigte sich sowohl initial nach Lappenhebung als auch über die gesamten 10 Tage des Versuchs eine deutlich gesteigerte Fließgeschwindigkeit in den Arteriolen der mit dem ETAB-Rezeptorblocker behandelten Tieren. Wohingegen die übrigen Versuchsgruppen keine Steigerung der Fließgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten.

6.1.3. Arteriölärer Durchmesser

Im proximalen und im zentralen Lappenareal (s. Abb. 16A+16B) kam es sowohl in den 3 Behandlungsgruppen als auch in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe zu einer kontinuierlichen arteriölären Dilatation über den Versuchszeitraum von 10 Tagen, welche jedoch in allen untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich war.

Im distalen Lappenareal (s. Abb. 16C) dagegen führte lediglich die selektive Blockade des ETB-Rezeptors zu einer vermehrten arteriölären Dilatation. Während an Tag 1 der arteriöläre Durchmesser noch vergleichbar zu den übrigen Versuchsgruppen war, beobachteten wir ab Tag 3 eine signifikant gesteigerte dilatatorische Antwort in Arteriolen.

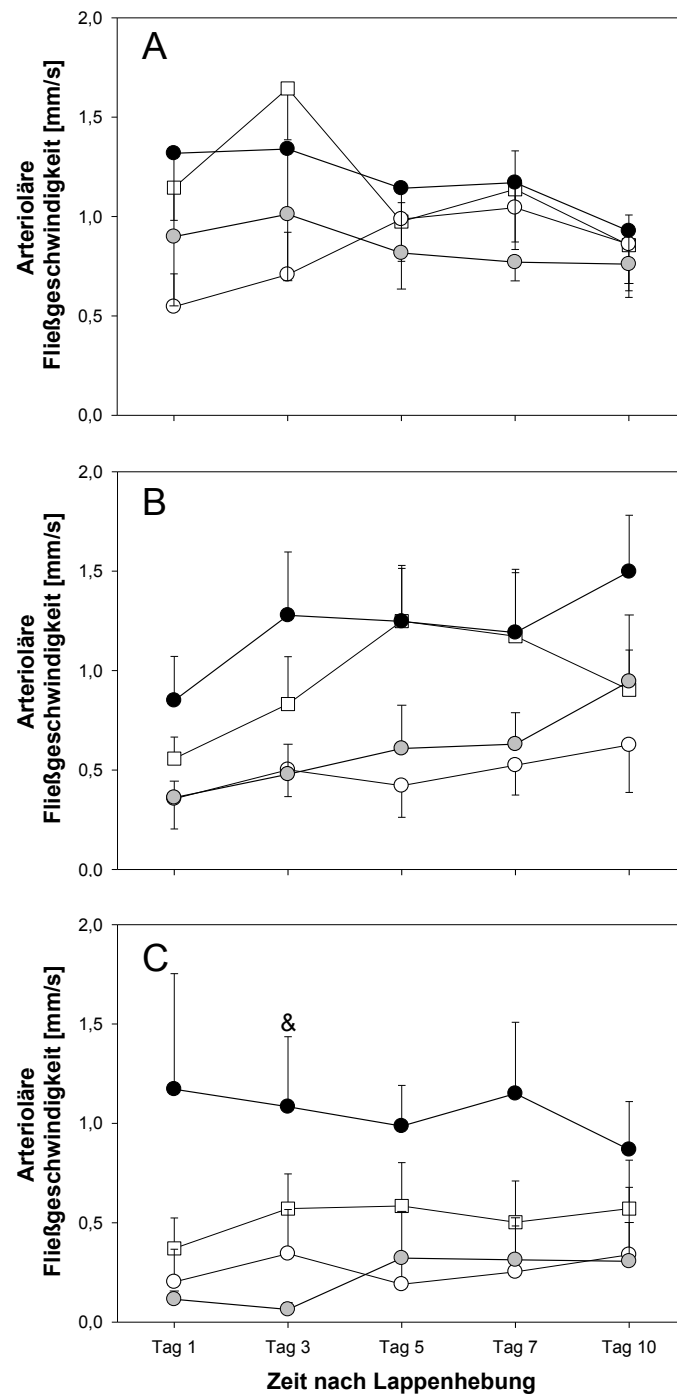


Abb. 15 : Arteriöläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit (in mm/s) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM.

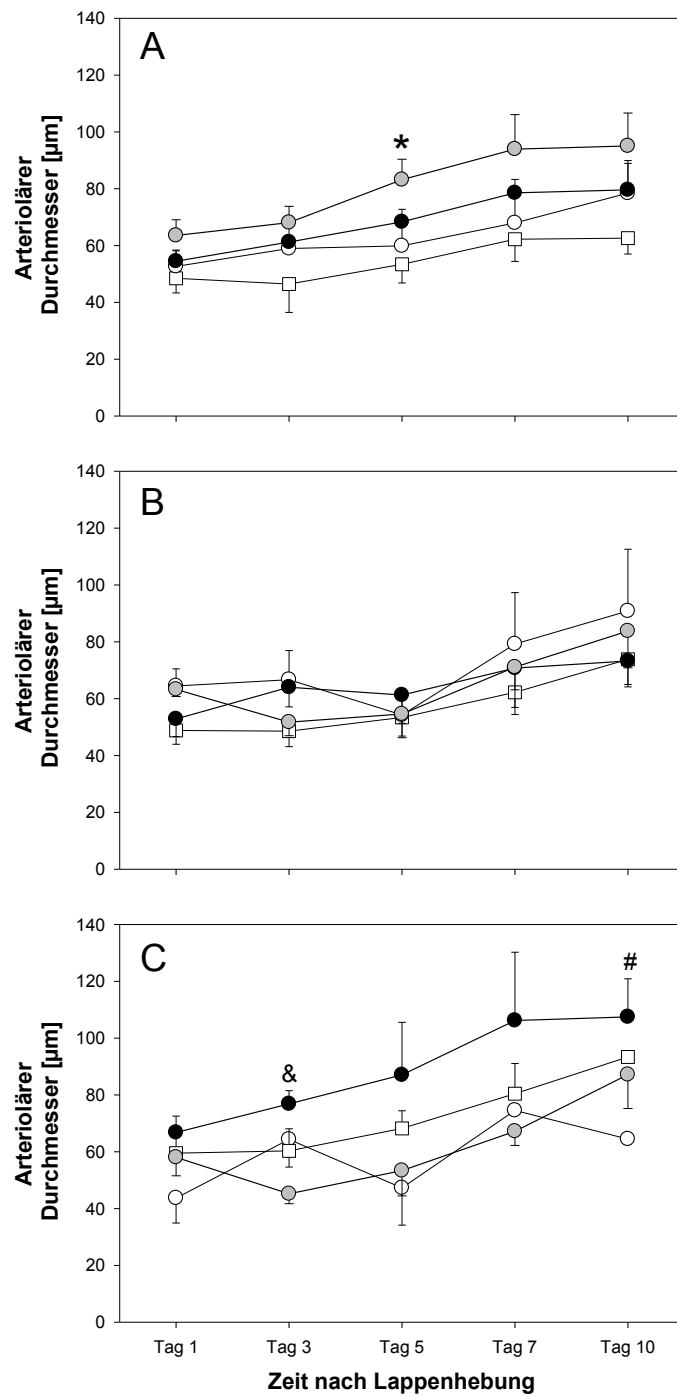


Abb. 16 : Arteriöler Durchmesser (in μm) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, & $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

6.1.4. Arterioler Blutfluss

Der arterioler Blutfluss, welcher sich aus der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und dem Gefäßdurchmesser errechnet, zeigte folglich sowohl im proximalen wie auch im zentralen Lappenareal ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede (s. Abb. 17A). Erwähnenswert ist die Tatsache, dass die unbehandelten Kontrolltiere an Tag 10 den niedrigsten Blutfluss aufwiesen.

Im zentralen Lappenareal (s. Abb. 17B) beobachteten wir vor allem während der Nekroseentstehung zwischen Tag 2 und 5 nach selektiver ETB-Rezeptorblockade einen signifikant erhöhten arteriolen Blutfluss.

Diese Beobachtung nach selektiver ETB-Rezeptorblockade war im distalen Lappenareal (s. Abb. 17C) noch deutlich ausgeprägter. In diesem Areal konnte im Vergleich zu den anderen Gruppen die signifikant verbesserte arterioler Durchblutung über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet werden.

6.1.5. Venuläre Fließgeschwindigkeit

Im proximalen Areal des Lappens (s. Abb. 18A) zeigte die venuläre Fließgeschwindigkeit, trotz anfänglich sehr unterschiedlicher Werte, keine signifikanten Unterschiede. Es kam zu einer gewissen Angleichung der Werte über die 10 Versuchstage.

Im zentralen Lappenareal (s. Abb. 18B) beobachteten wir interessanterweise im Vergleich zur selektiven ETA- und zur selektiven ETAB-Rezeptorblockade sowohl in Kontrollen als auch nach selektiver ETB-Rezeptorblockade eine deutlich erhöhte Fließgeschwindigkeit in den Venulen.

Diese Veränderung fand sich auch im distalen Lappenareal wieder (s. Abb. 18C). Insbesondere anlässlich der für die Nekroseentstehung wichtigen Tage 1 bis 5 nach Lappenhebung.

6.1.6. Venulärer Durchmesser

Im proximalen und zentralen Lappenareal (s. Abb. 19A + 19B) zeigten die behandelten Gruppen keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zur NaCl-behandelten Kontrollgruppe. In allen 4 Versuchsgruppen kam es zu einer Steigerung des venulären

Gefäßdurchmessers. Die kombinierte Blockade des Endothelinrezeptors mit dem ETAB-Rezeptorblocker jedoch bewirkte eine tendenziell etwas stärkere Dilatation.

Auch im distalen Lappenareal (s. Abb. 19C) zeigten sich innerhalb der von uns verwendeten Versuchsgruppen keine Unterschiede bzgl. der venulären Dilatation. Der venuläre Gefäßdurchmesser nahm in allen Tieren über die 10 Tage andauernde Ischämie kontinuierlich zu.

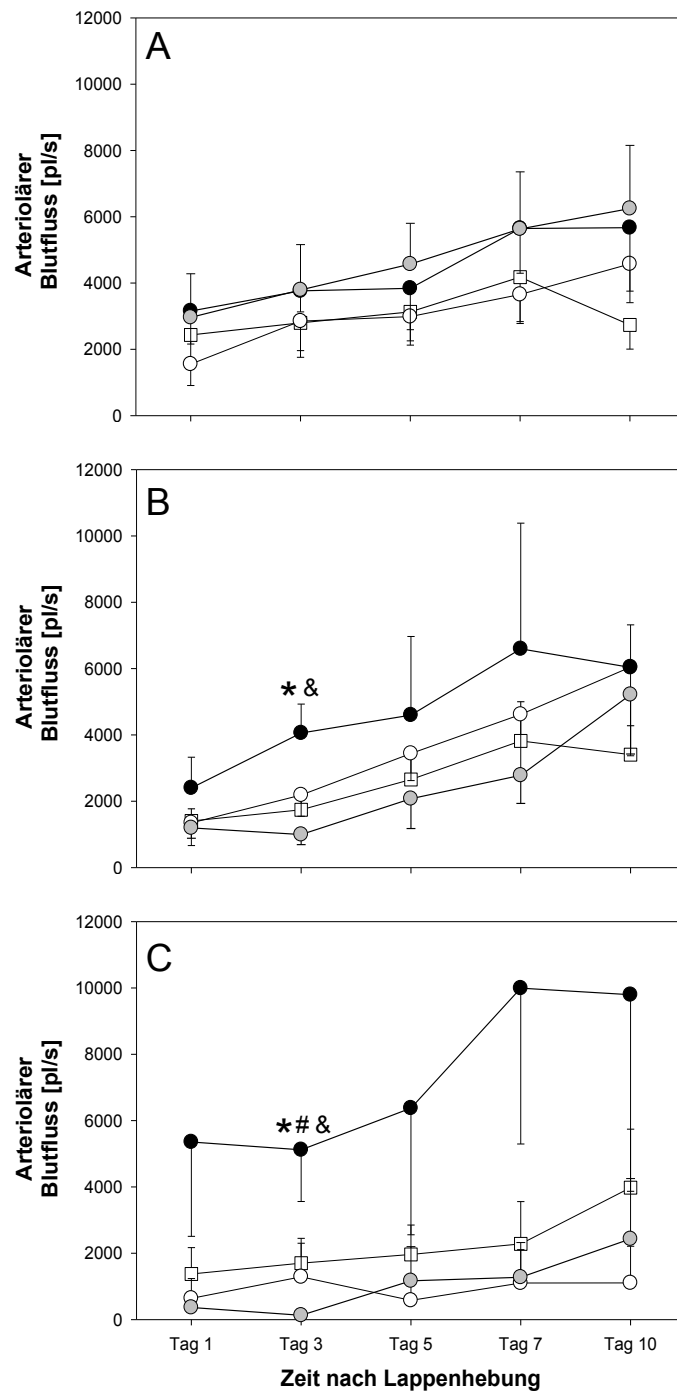


Abb. 17 : Arteriöler Blutfluss (in pl/s) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, & $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

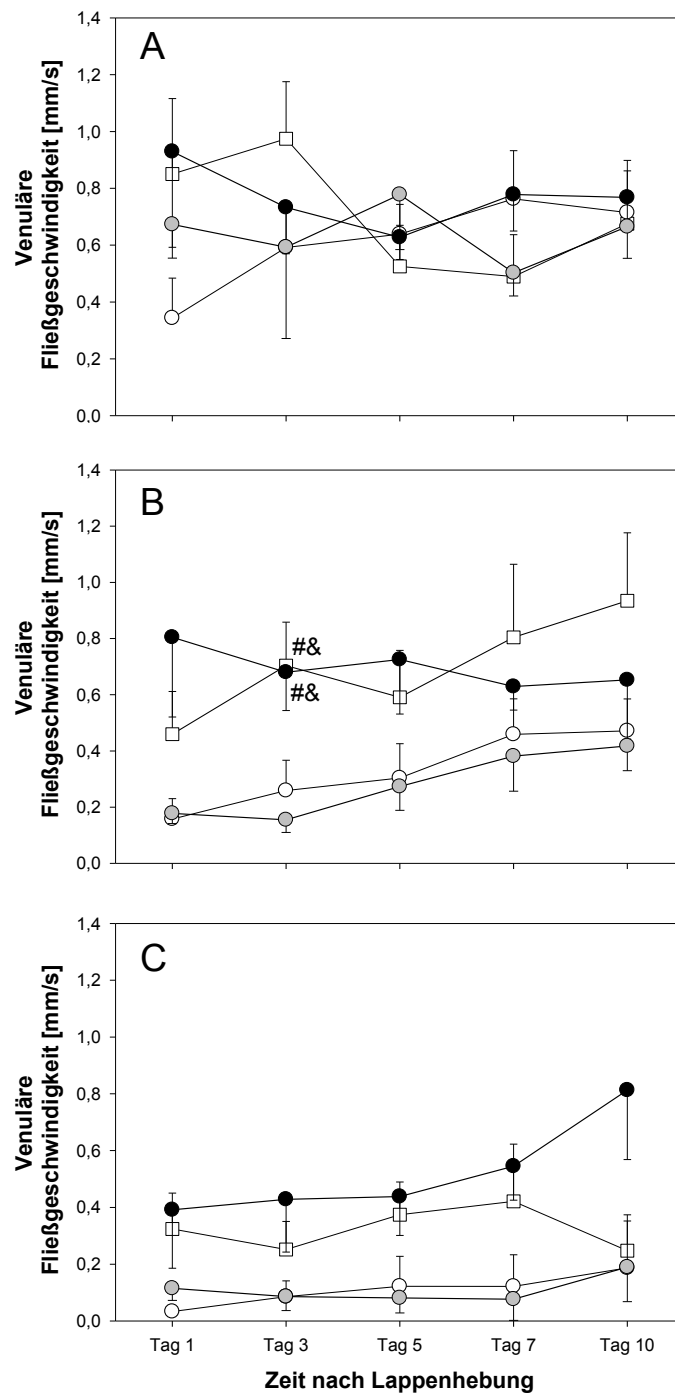


Abb. 18 : Venuläre Fließgeschwindigkeit (in mm/s) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, [#] $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, [&] $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

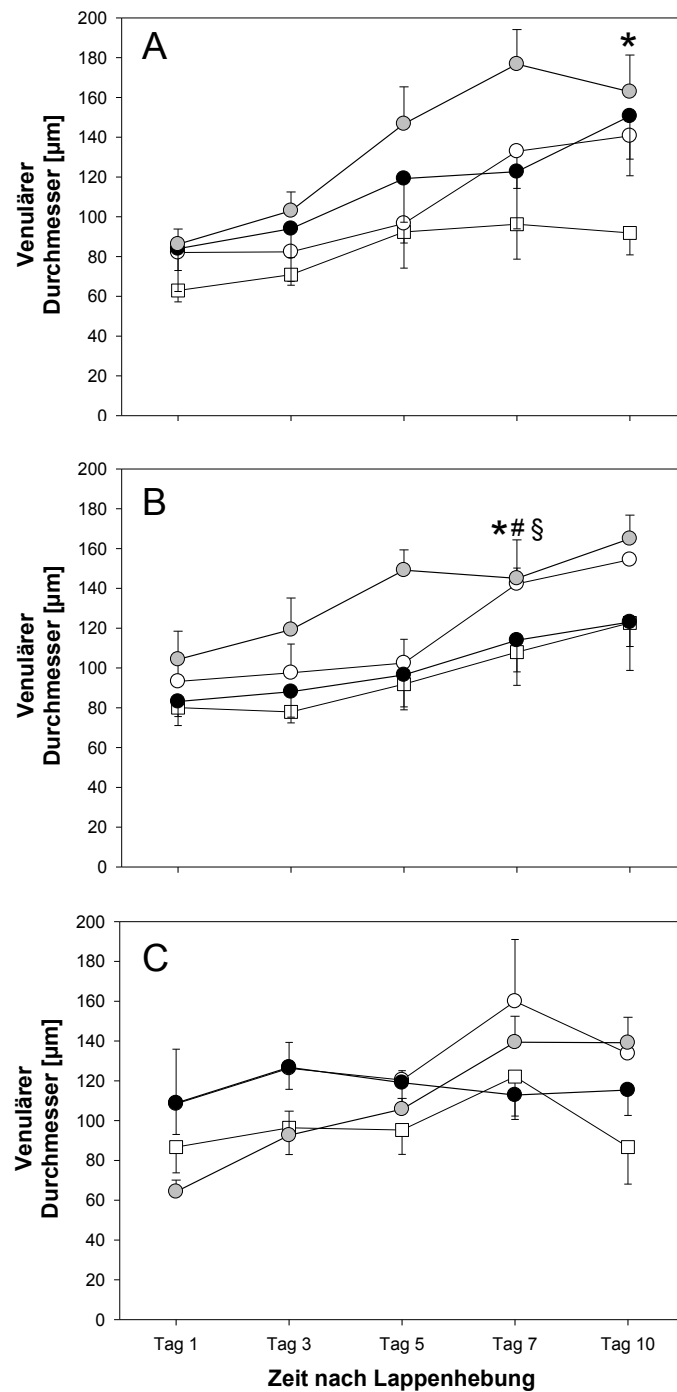


Abb. 19 : Venulärer Durchmesser (in μm) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, § $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

6.1.7. Venulärer Blutfluss

Der venuläre Blutfluss im proximalen Areal (s. Abb. 20A) zeigte keinerlei signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Jedoch konnte man beobachten, dass es ab dem 5. Versuchstag in den Behandlungsgruppen zu einer deutlichen Steigerung des Blutflusses in Venulen kam. Die mit NaCl behandelte Kontrollgruppe hingegen zeigte über die 10 Tage keinerlei Steigerung des venulären Blutflusses.

Im zentralen Areal des Lappens (s. Abb. 20B) hingegen beobachteten wir in allen Versuchsgruppen, inklusive der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe eine Steigerung des venulären Blutflusses, die in der Kontrolle im Bereich von 250% lag (Tag 1 vs. Tag 10). Die übrigen Gruppen steigerten ebenfalls ihre venuläre Perfusion.

Im distalen Abschnitt (s. Abb. 20C) zeigte die selektive Blockade des Endothelin-B-Rezeptors eine manifest gesteigerte venuläre Perfusion im Vergleich zu allen übrigen Versuchsgruppen. Letztere konnten keine adäquate venuläre Perfusion aufrecht erhalten.

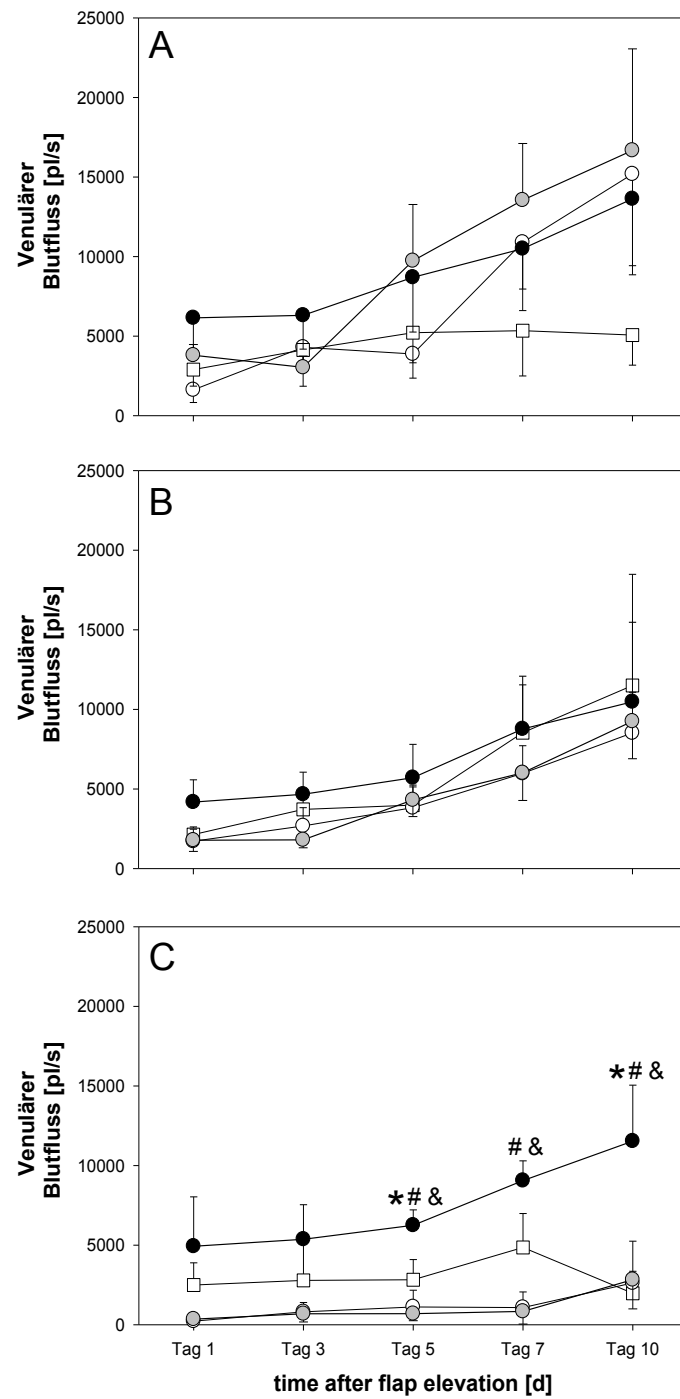


Abb. 20 : Venulärer Blutfluss (in pl/s) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, & $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

6.1.8. Kapillare Fließgeschwindigkeit

Die Fließgeschwindigkeit in den Kapillaren zeigte sowohl im proximalen (s. Abb. 21A) wie auch im zentralen Lappenareal (s. Abb. 21B) zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und den Kontrolltieren keinerlei Unterschiede, d.h. in allen Gruppen beobachteten wir über den gesamten Versuchszeitraum von 10 Tagen einen leichten Anstieg der kapillaren Fließgeschwindigkeit.

Distal im Lappen (s. Abb. 21C) beobachteten wir während der ersten 5 Tage nach Lappenhebung bei Kontrollen und bei den mit dem selektiven ETB-Rezeptorblocker behandelten Tieren eine deutlich erhöhte kapillare Fließgeschwindigkeit. Diese war ab Tag 7 in allen Gruppen wieder vergleichbar.

6.1.9. Kapillarer Durchmesser

Die Durchmesser der Kapillaren zeigten in allen 3 Lappenarealen, d.h. proximal, zentral und distal keinerlei größere Unterschiede (s. Abb. 22A, Abb. 22B + Abb. 22C). Es kam in allen Versuchsgruppen ebenso wie in der Kontrollgruppe zu einer vergleichbaren kapillaren Dilatation über die 10 Tage des Versuchs. Lediglich an Tag 7 und 10 zeigten sich geringfügige Unterschiede, welche jedoch letztlich für die Nekroseentstehung keinerlei Rolle mehr spielen konnten.

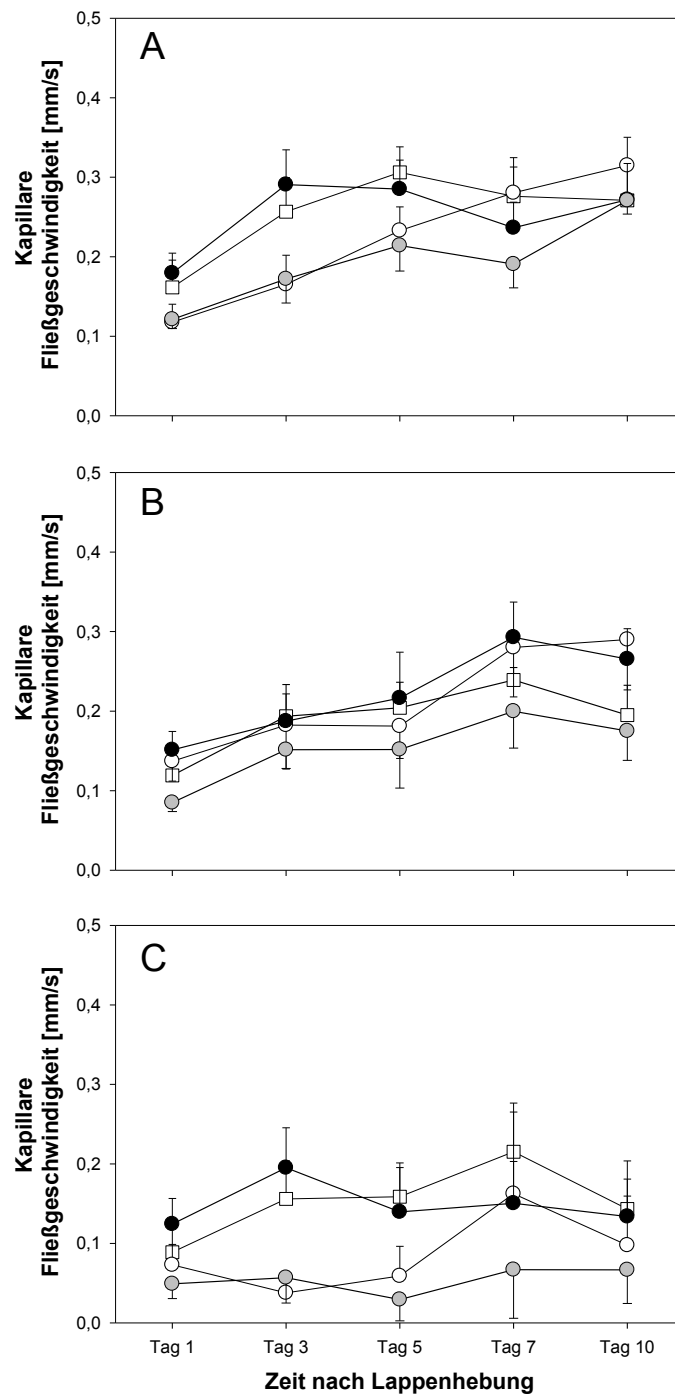


Abb. 21 : Kapillare Fließgeschwindigkeit (in mm/s) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM.

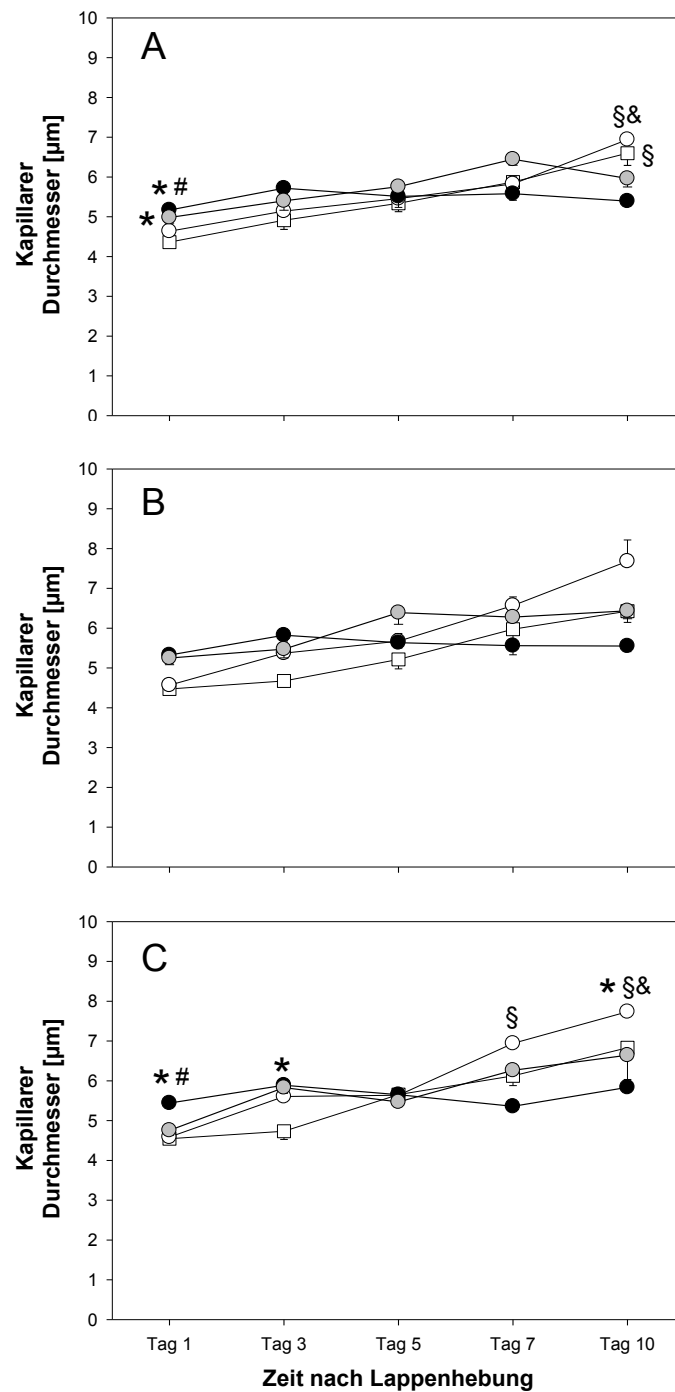


Abb. 22 : Kapillarer Durchmesser (in μm) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, § $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade, & $p < 0,05$ vs. ETB-Rezeptorblockade.

6.1.10. Kapillarer Blutfluss

Proximal im Lappen (s. Abb. 23A) beobachteten wir während der Demarkierung der Nekrose, d.h. während der ersten 5 Tage des Versuchs, einen signifikant vermehrten kapillaren Blutfluss nach Gabe des ETB-Rezeptorblockers, wohingegen sich der Kapillarfluss der anderen Gruppen trotz kontinuierlicher Steigerung nicht wesentlich unterschied.

Diese Tendenz war auch im zentralen Lappenareal erkennbar (s. Abb. 23B), wenn auch deutlich weniger ausgeprägt.

Distal im Lappen (s. Abb. 23C) zeigten die mit dem ETB-Rezeptorblocker behandelten Tiere einen adäquaten Blutfluss in den Kapillaren, der bereits an Tag 1 nach Lappenhebung vorhanden war, wohingegen die selektive ETA-Rezeptorblockade und NaCl-Gabe eine Steigerung des Kapillarflusses erst ab den Tagen 5 bis 7 bewirkte.

6.1.11. Funktionelle Kapillardichte

Proximal im Lappen (s. Abb. 24A) zeigten mit Ausnahme der selektiven ETB-Rezeptorblockade alle Versuchsgruppen, ebenso wie die mit NaCl-behandelte Kontrollgruppe, eine Abnahme der funktionellen Kapillardichte um ca. 10-25 % über den Versuchszeitraum von 10 Tagen. Die selektive ETB-Rezeptorblockade konnte im Gegensatz dazu die funktionelle Kapillardichte über 10 Beobachtungstage vollständig aufrechterhalten.

Diese Aufrechterhaltung der nutritiven Perfusion durch Blockade des ETB-Rezeptors wurde in gleichem Ausmaß auch im zentralen Lappenareal beobachtet (s. Abb. 24B), während die funktionelle Kapillardichte in den übrigen Gruppen mit derjenigen des proximalen Lappenareals vergleichbar war.

Im kritisch perfundierten distalen Lappenareal (s. Abb. 24C) beobachteten wir nach Blockade des ETB-Rezeptors eine über 10 Tage erhaltene Kapillarperfusion von ca. 150 cm/cm², während in den übrigen Versuchsgruppen inklusive der Kontrolltiere die funktionelle Kapillardichte auf durchschnittlich 50 cm/cm² zusammenbrach.

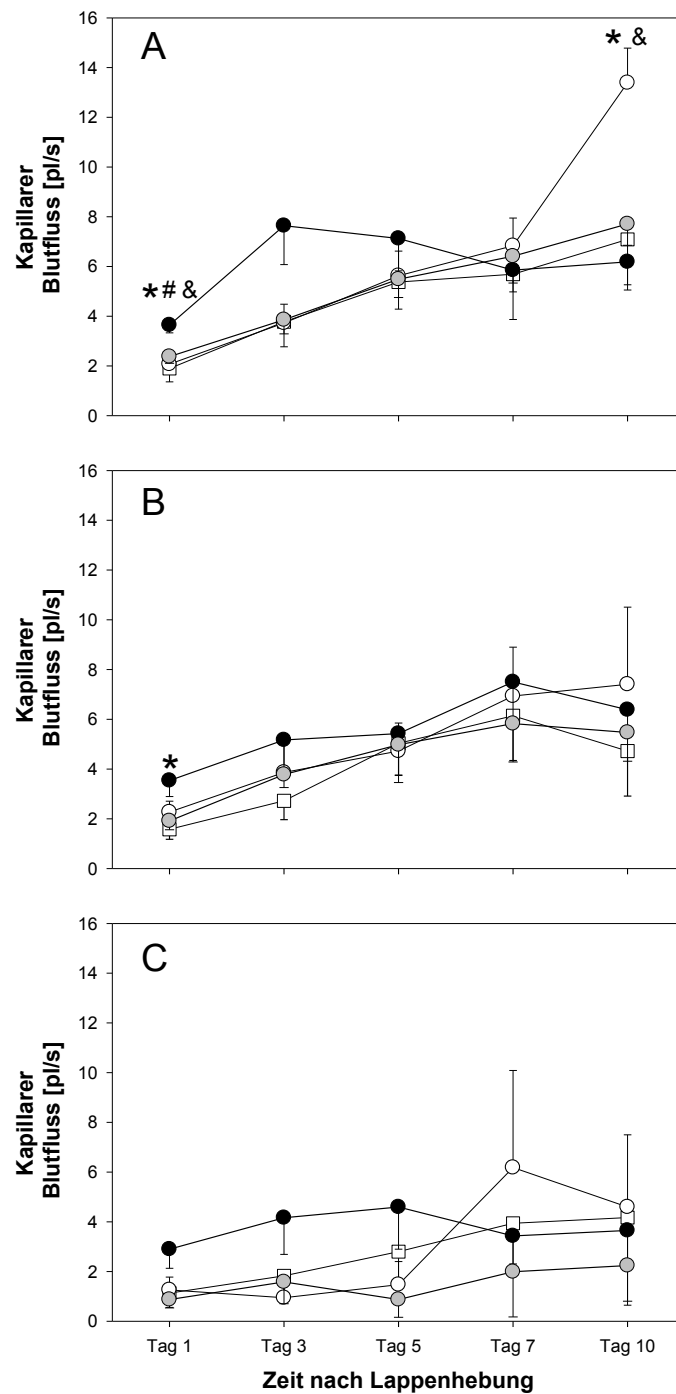


Abb. 23 : Kapillärer Blutfluss (in pl/s) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, & $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

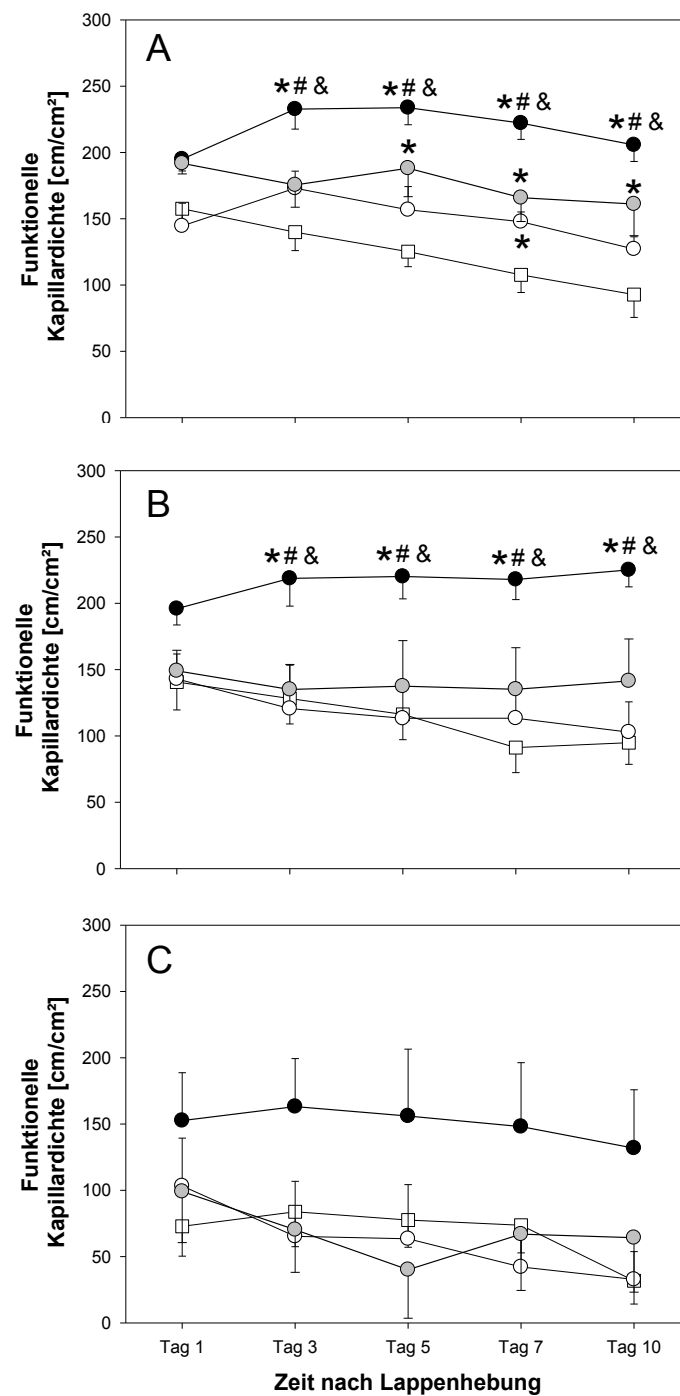


Abb. 24 : Funktionelle Kapillardichte (in cm/cm²) nach Endothelin-A- (weiße Kreise), Endothelin-B- (schwarze Kreise) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, & $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

6.1.12. Apoptotischer Zelltod

Die selektive Blockade des Endothelin-B-Rezeptors führte an den Tagen 1, 3 und 5 nach Lappenhebung in allen 3 Lappenarealen (s. Abb. 25A-C) zu einer signifikanten Reduktion des apoptotischen Zelltodes.

Proximal und zentral im Lappen war der apoptotische Zelltod in den übrigen Gruppen vergleichbar. Lediglich distal im Lappen zeigte sich ab Tag 3 auch nach selektiver ETA-Rezeptorblockade und nach unspezifischer ETAB-Rezeptorblockade gegenüber den mit NaCl-behandelten Kontrollen eine signifikante Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen.

6.1.13. Angiogenese

Sowohl die selektive ETA-, die ETB- als auch die ETAB-Rezeptorblockade bewirkte ebenso wie die NaCl-Behandlung der Kontrollgruppe in keinem Lappenabschnitt eine Ausbildung neuer Mikrogefäße. Es konnte zu keinem Beobachtungszeitraum über den gesamten Versuchszeitraum von 10 Tagen eine Angiogenese gefunden werden.

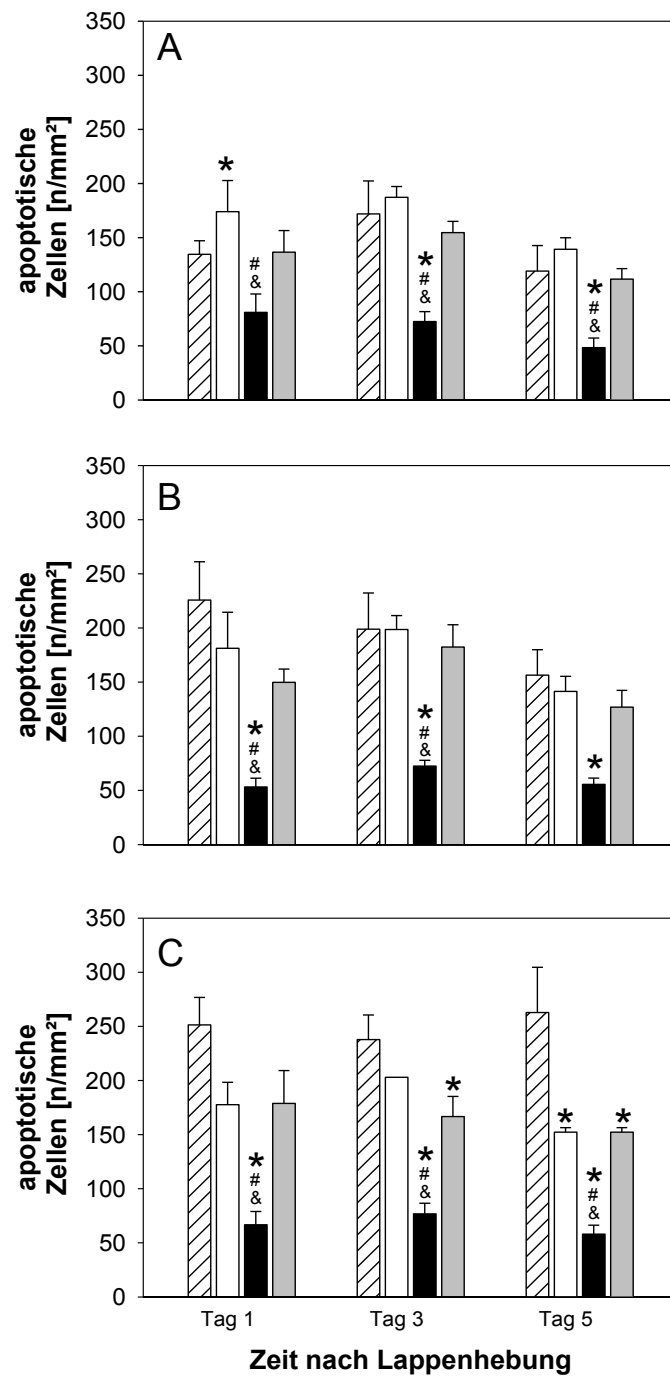


Abb. 25 : Apoptotische Zellen (in n/mm^2) nach Endothelin-A- (weiße Balken), Endothelin-B- (schwarze Balken) und Endothelin-AB-Rezeptorblockade (graue Balken) sowie nach NaCl-Behandlung (gestreifte Balken) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert + SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. ETA-Rezeptorblockade, & $p < 0,05$ vs. ETAB-Rezeptorblockade.

6.2. Induktion und Inhibition der NO-Synthase

6.2.1 Nekrotische Gewebefläche

Der mikrozirkulatorische Perfusionsausfall bzw. die nekrotische Gewebefläche, angegeben in % der Gesamtlappenfläche (s. Abb.26), blieb über den Versuchszeitraum von 10 Tagen in allen Versuchsgruppen gegenüber Tag 1 ungefähr gleich. Die Tiere, die mit L-NAME behandelt wurden, wiesen dabei bereits initial eine deutlich größere nekrotische Gewebefläche auf, welche an Tag 10 nach Lappenhebung im Vergleich zu den übrigen Gruppen signifikant stärker ausgeprägt war. Die Behandlung mit L-Arginin dagegen bewirkte insbesondere nach 2-facher L-Arginingabe bereits an Tag 1 nach Lappenhebung eine Verbesserung der Mikrozirkulation, welche am Tag 10 in einer knapp 15 % geringeren Nekrose resultierte. Die einfache Gabe von L-Arginin verringerte die nekrotische Gewebefläche über den Versuchszeitraum von 10 Tagen nur geringfügig.

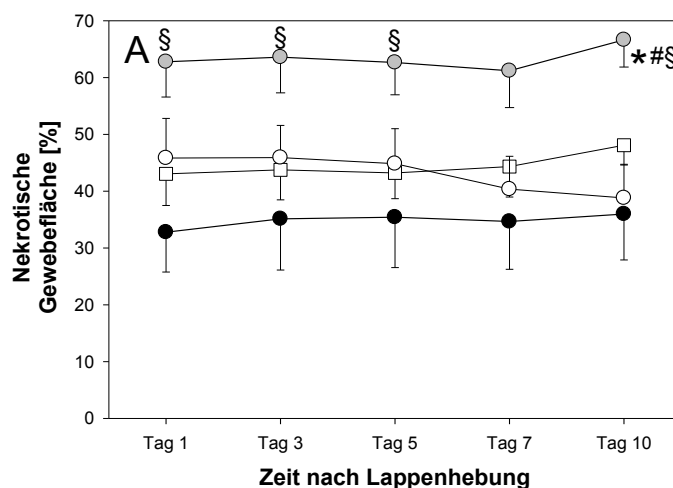


Abb. 26 : Nekrotische Gewebefläche (in %) nach L-Arginin (weiße Kreise), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate). Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. L-Arginin, § $p < 0,05$ vs. L-Arginin².

6.2.3. Arteriöläre Fließgeschwindigkeit

Gruppe	Lappenanteil	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d
Kontrolle		1,19±0,21	1,72±0,21	1,36±0,32	1,27±0,22	1,15±0,30
L-Arginin	proximal	1,16±0,26	1,34±0,08	1,60±0,28	1,42±0,24	1,27±0,26
L-Arginin²		0,75±0,16	0,68±0,08	0,62±0,12	0,70±0,10	0,96±0,21
L-NAME		0,80±0,15	1,33±0,26	1,29±0,35	1,29±0,31	1,56±0,44
Kontrolle		0,67±0,11	1,25±0,25	1,45±0,23	1,20±0,28	1,02±0,18
L-Arginin	zentral	0,68±0,11	1,00±0,21	0,86±0,17	1,11±0,20	0,75±0,18
L-Arginin²		0,87±0,13	1,26±0,27	1,27±0,26	1,07±0,24	0,69±0,09
L-NAME		0,55±0,23	0,41±0,14	0,89±0,29	0,91±0,26	0,82±0,29
Kontrolle		0,42±0,13	0,67±0,17	0,83±0,18	0,98±0,30	0,76±0,23
L-Arginin	distal	0,36±0,11	0,55±0,15	0,50±0,15	0,88±0,21	0,58±0,19
L-Arginin²		0,21±0,07	0,49±0,15	0,54±0,21	0,46±0,14	0,39±0,19
L-NAME		0,34±0,16	0,59±0,29	0,38±0,21	0,53±0,35	0,19±0,17

Tabelle 1 : Darstellung der arteriölären Fließgeschwindigkeit (in mm/s) jeweils im proximalen, zentralen und distalen Lappenanteil nach Gabe von L-Arginin, L-Arginin in doppelter Dosierung (L-Arginin²), L-NAME sowie nach NaCl-Behandlung. Mittelwert ± SEM.

6.2.3. Arteriölärer Durchmesser

Über den ganzen Beobachtungszeitraum von 10 Tagen zeigten alle behandelten Gruppen, inklusive der Kontrollen, in allen Lappenarealen eine relativ konstante Dilatation in perfundierten Arteriolen, welche zwischen 35% und 75% lag (s. Abb. 27A-C).

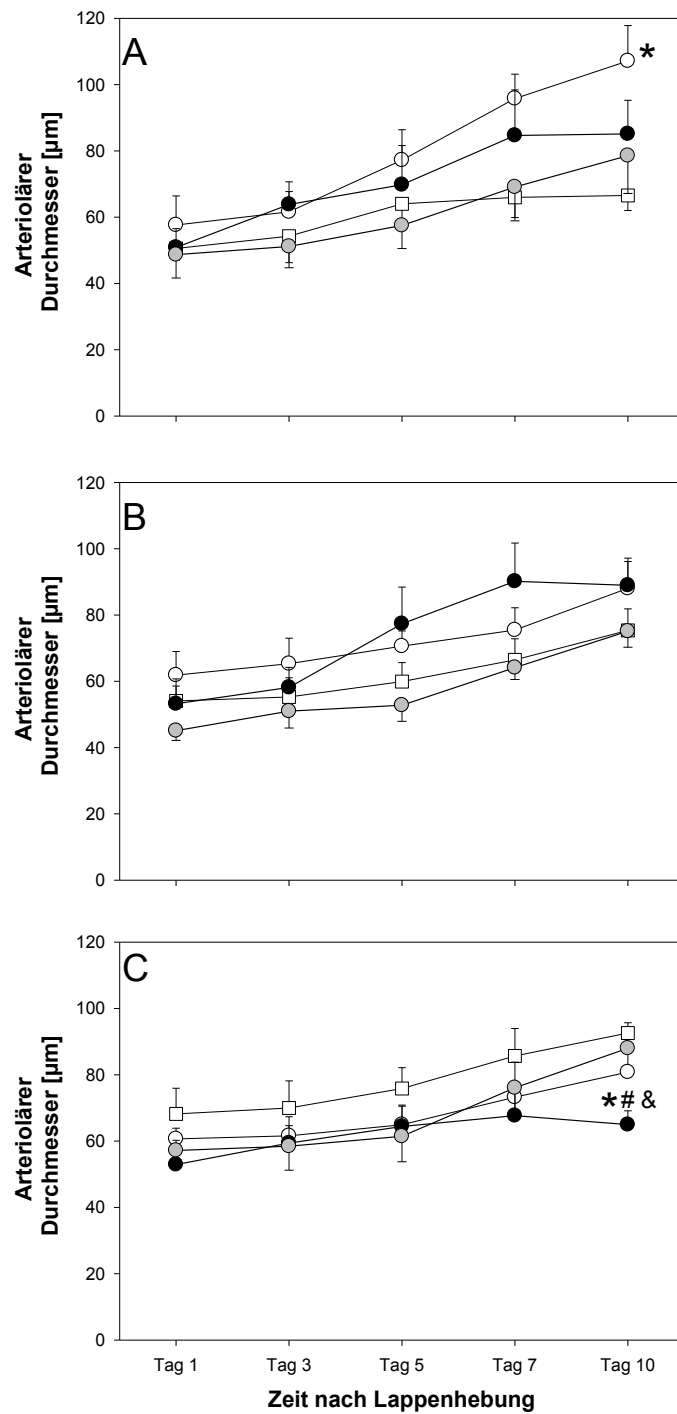


Abb. 27 : Arteriöler Durchmesser (in µm) nach L-Arginin (weiße Kreise), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. # $p < 0,05$ vs. L-Arginin, & $p < 0,05$ vs. L-NAME

6.2.4. Arterioler Blutfluss

Proximal beobachteten wir in allen Versuchsgruppen einen Anstieg des arteriölen Blutflusses (s. Abb. 28A). Auffallend war die starke Zunahme des Blutflusses nach Behandlung mit L-Arginin in der einfachen Dosierung von durchschnittlich 500 % ab Tag 5 unseres Versuchs (320% gegenüber Tag 1).

Im zentralen Lappenareal war die Zunahme der arteriölen Perfusion vergleichbar mit derjenigen im proximalen Lappenareal (s. Abb. 28B). Zu erwähnen ist, dass die L-Arginindosierung in einfacher Dosierung im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Blutflusssteigerung bewirkte.

Distal im Lappen beobachteten wir v.a. nach L-Arginin- (in beiden Dosierungen) und L-NAME-Gabe eine marginale arteriöle Perfusion über die ersten 5 Tage, d.h. während der Nekroseentstehung (s. Abb. 28C).

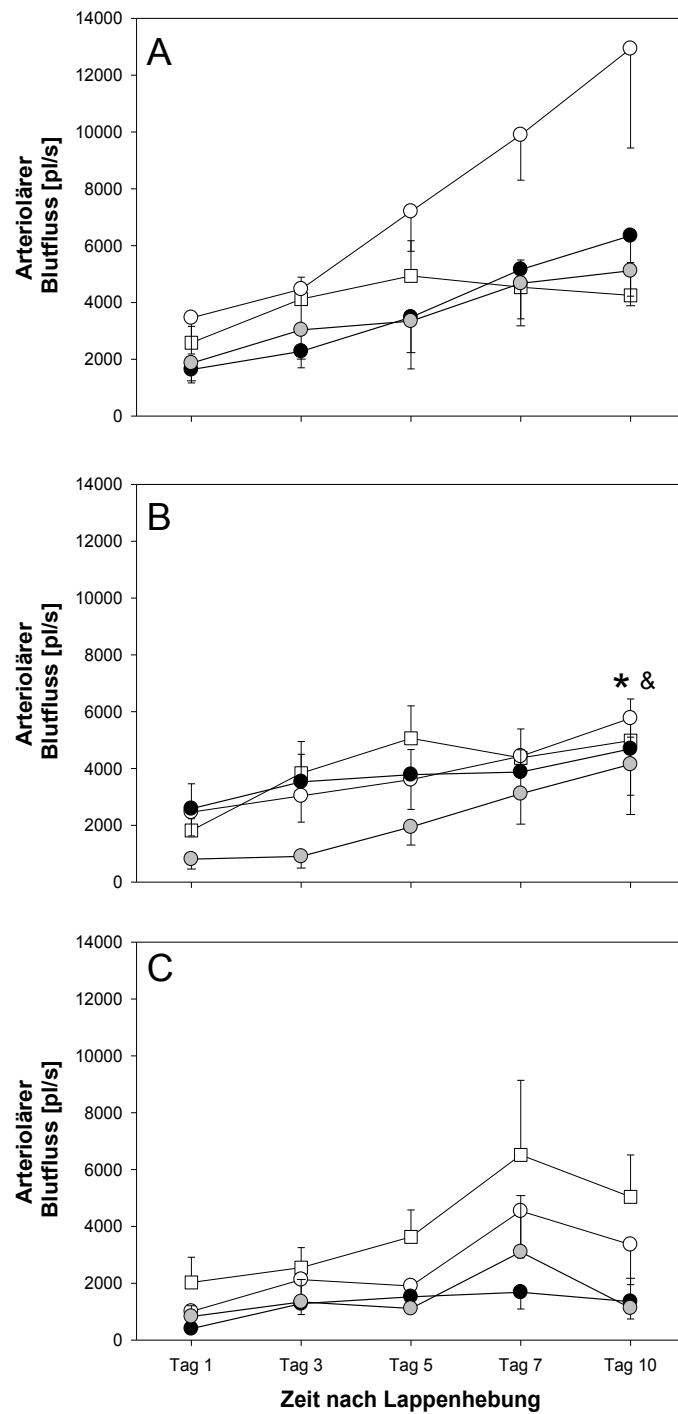


Abb. 28 : Arteriolarer Blutfluss (in pl/s) nach L-Arginin (weiße Kreise), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, & $p < 0,05$ vs. L-NAME.

6.2.5. Venuläre Fließgeschwindigkeit

Gruppe	Lappenanteil	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d
Kontrolle		0,85±0,17	0,91±0,09	0,75±0,13	0,75±0,14	0,76±0,19
L-Arginin	proximal	0,58±0,07	0,61±0,10	0,47±0,07	0,75±0,05	0,85±0,11
L-Arginin²		0,47±0,10	0,52±0,10	0,52±0,04	0,42±0,11	0,77±0,16
L-NAME		0,43±0,10	0,58±0,13	0,66±0,14	0,69±0,13	0,64±0,12
Kontrolle		0,54±0,14	0,66±0,11	0,52±0,13	0,85±0,20	1,03±0,20
L-Arginin	zentral	0,49±0,8	0,56±0,10	0,65±0,10	0,72±0,12	0,95±0,11
L-Arginin²		0,29±0,07	0,53±0,09	0,52±0,13	0,80±0,18	0,81±0,26
L-NAME		0,32±0,12	0,28±0,10	0,51±0,14	0,73±0,21	0,44±0,16
Kontrolle		0,29±0,10	0,41±0,15	0,55±0,15	0,72±0,19	0,37±0,11
L-Arginin	distal	0,16±0,06	0,34±0,07	0,36±0,09	0,61±0,15	0,33±0,09
L-Arginin²		0,14±0,03	0,21±0,06	0,27±0,08	0,25±0,08	0,36±0,17
L-NAME		0,08±0,04	0,11±0,05	0,13±0,05	0,25±0,17	0,08±0,07

Tabelle 2 : Darstellung der venulären Fließgeschwindigkeit (in mm/s) jeweils im proximalen, zentralen und distalen Lappenanteil nach Gabe von L-Arginin, L-Arginin in doppelter Dosierung, L-NAME sowie nach NaCl-Behandlung. Mittelwert ± SEM.

6.2.6. Venulärer Durchmesser

Im proximalen Areal des Lappens (s. Abb. 29A) zeigten alle Tiere bis zum 5. Tag eine vergleichbare venuläre Dilatation, welche nach L-Arginingabe (in beiden Dosierungen) weiter zunahm. Auffallend war die Abnahme der venulären Dilatation ab Tag 5 nach Gabe von L-NAME.

Zentral im Lappen beobachteten wir in allen Gruppen, inklusive der Kontrollgruppe, eine vergleichbare venuläre Dilatation (s. Abb. 29B).

Im distalen Lappenareal zeigten die mit L-Arginin behandelten Tiere (in beiden Dosierungen) eine venuläre Dilatation, welche gegenüber den Kontrollen ausgeprägter war (s. Abb. 29C). Nach L-NAME-Gabe beobachteten wir bereits an Tag 1 eine weniger ausgeprägte venuläre Dilatation, welche auch über die folgenden 10 Tage unverändert blieb.

6.2.7. Venulärer Blutfluss

Im proximalen und zentralen Lappenareal zeigte sich in allen Gruppen, inklusive den Kontrollen, kein wesentlicher Unterschied (s. Abb. 30A + B). Wir beobachteten über die 10 Tage des Versuchs einen leichten Anstieg des venulären Blutflusses. Auffallend ist nur zu erwähnen, dass die L-NAME-Gabe an Tag 10 die niedrigste venuläre Perfusion aufwies.

Distal im Lappen zeigte sich ebenfalls kein wesentlicher Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe (s. Abb. 30C). Wir beobachteten ebenfalls einen leichten Anstieg der venulären Perfusion, wenn auch auf einem niedrigeren Niveau. Nach L-NAME-Gabe zeigte sich ein nahezu vollständiges Erliegen des venulären Blutflusses.

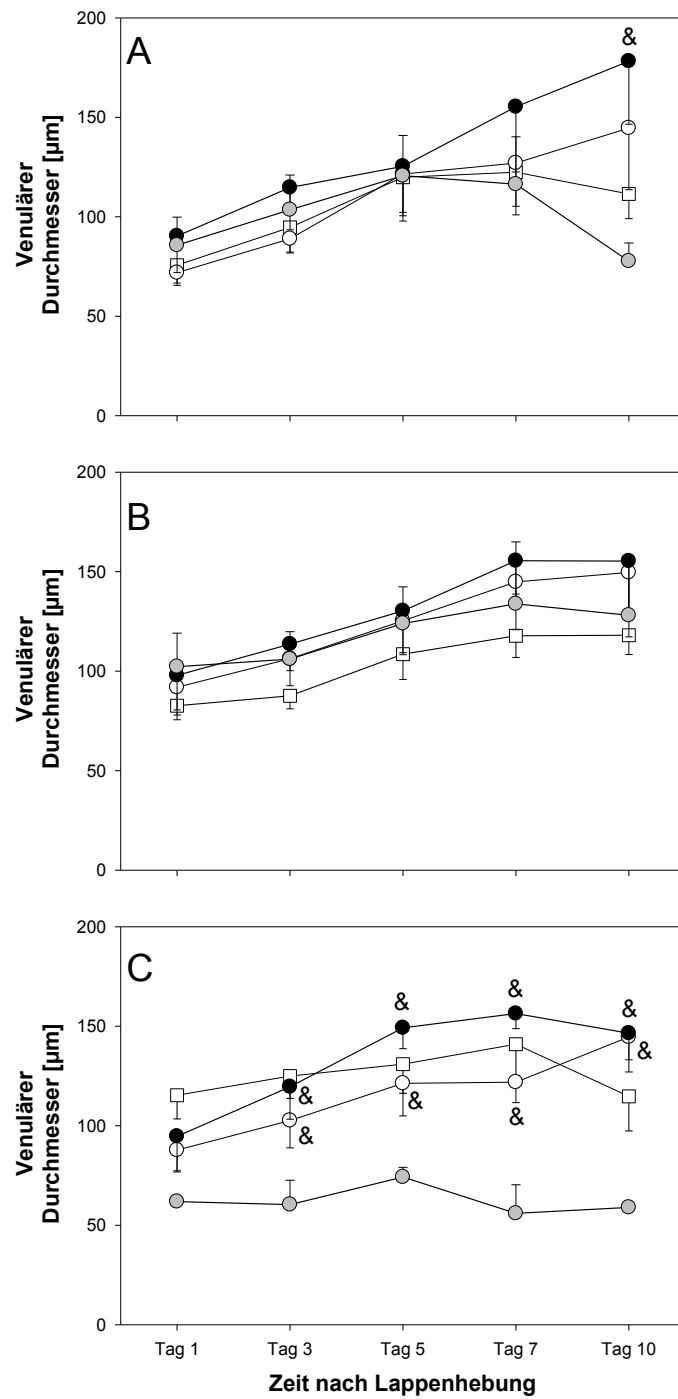


Abb. 29 : Venulärer Durchmesser (in μm) nach L-Arginin (weiße Kreise), , L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen Abschnitt des muskulokutanen Lappens (C). Mittelwert \pm SEM, & $p < 0,05$ vs. L-NAME.

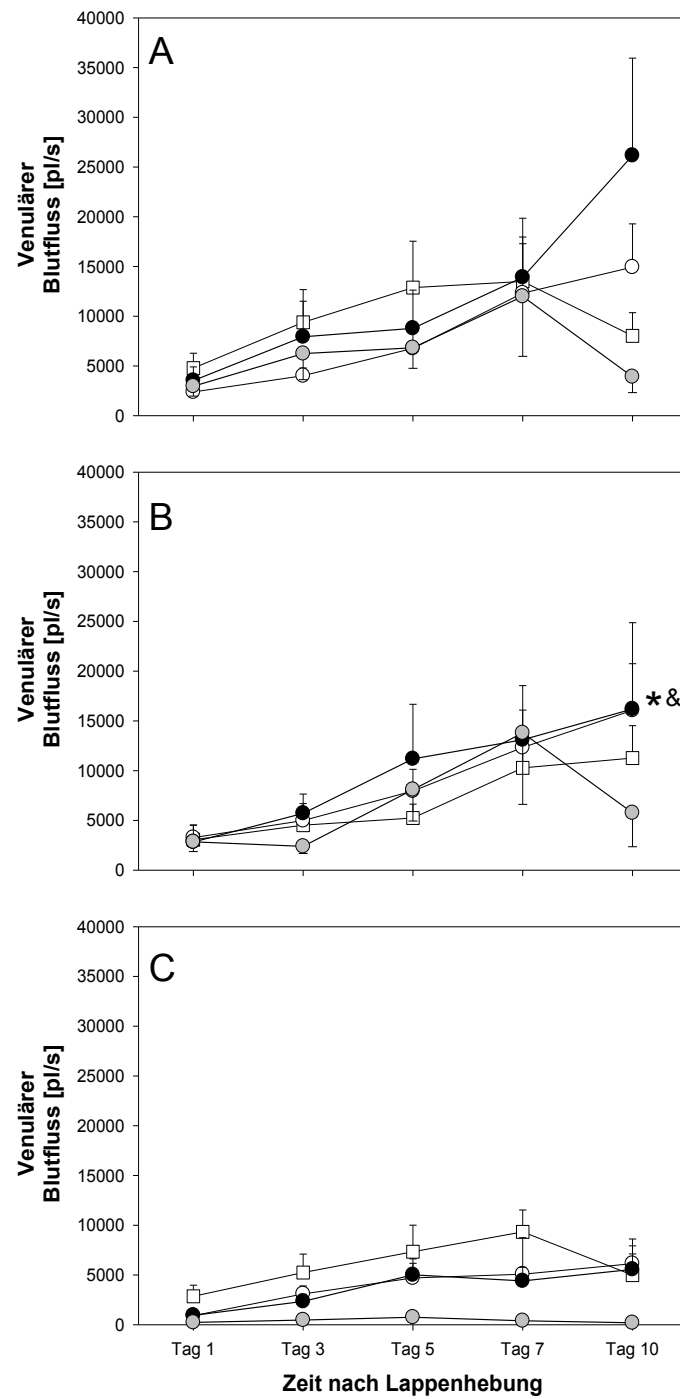


Abb. 30 : Venulärer Blutfluss (in pl/s) nach L-Arginin (weiße Kreise), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, & $p < 0,05$ vs. L-NAME.

6.2.8. Kapillare Fließgeschwindigkeit

Im proximalen Lappenareal beobachteten wir in allen Gruppen, inklusive der Kontrollgruppe, keine wesentlichen Unterschiede (s. Abb. 31A). Es fand sich in allen Gruppen zu einer leichten Zunahme der kapillaren Fließgeschwindigkeit über die 10 Tage unseres Versuchs.

Im zentralen Areal beobachteten wir nach Gabe von L-Arginin in doppelter Dosierung eine deutlich bessere kapillare Fließgeschwindigkeit im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrollen (s. Abb. 31B). Im Vergleich zur Gabe von L-NAME zeigte sich durch Gabe von L-Arginin in doppelter Dosierung eine signifikant höhere kapillare Fließgeschwindigkeit.

Distal im Lappen beobachteten wir über den Versuchszeitraum eine deutlich schlechtere kapillare Fließgeschwindigkeit (s. Abb. 31C), welche sich in einem nahezu identischen Bild in den einzelnen Versuchsgruppen widerspiegelte. Bei den mit L-NAME behandelten Tieren beobachteten wir bereits zu Beginn des Versuchs die geringste Fließgeschwindigkeit im Vergleich zu den übrigen Gruppen sowie der Kontrollgruppe. Im Verlauf über die 10 Tage des Versuchs nahm die Fließgeschwindigkeit bei den mit L-NAME behandelten Tieren sogar noch weiter ab.

6.2.9. Kapillarer Durchmesser

Im proximalen Lappenareal beobachteten wir eine leichte Zunahme der kapillaren Gefäßdurchmesser über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen (s. Abb. 32A). Dabei beobachteten wir in allen Versuchsgruppen, inklusive der Kontrolle, keinen wesentlichen Unterschied.

Zentral im Lappen beobachteten wir durch Gabe von L-Arginin sowohl nach einfacher als auch nach doppelter Dosierung eine deutlich gesteigerte kapillare Dilatation im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 32B). Die Tiere, welche mit L-NAME behandelt wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrolle dagegen eine deutlich geringere kapillare Dilatation über gesamten Beobachtungszeitraum auf.

Auch im distalen Lappenareal bewirkte die Behandlung mit L-NAME eine signifikant geringere kapillare Dilatation im Vergleich zu den mit L-Arginin in unterschiedlichen Dosierungen behandelten Tieren (s. Abb. 32C). Im Vergleich zur Kontrolle beobachteten wir ebenfalls ab Tag 7 unseres Versuchs eine signifikante Verringerung des Gefäßdurchmessers.

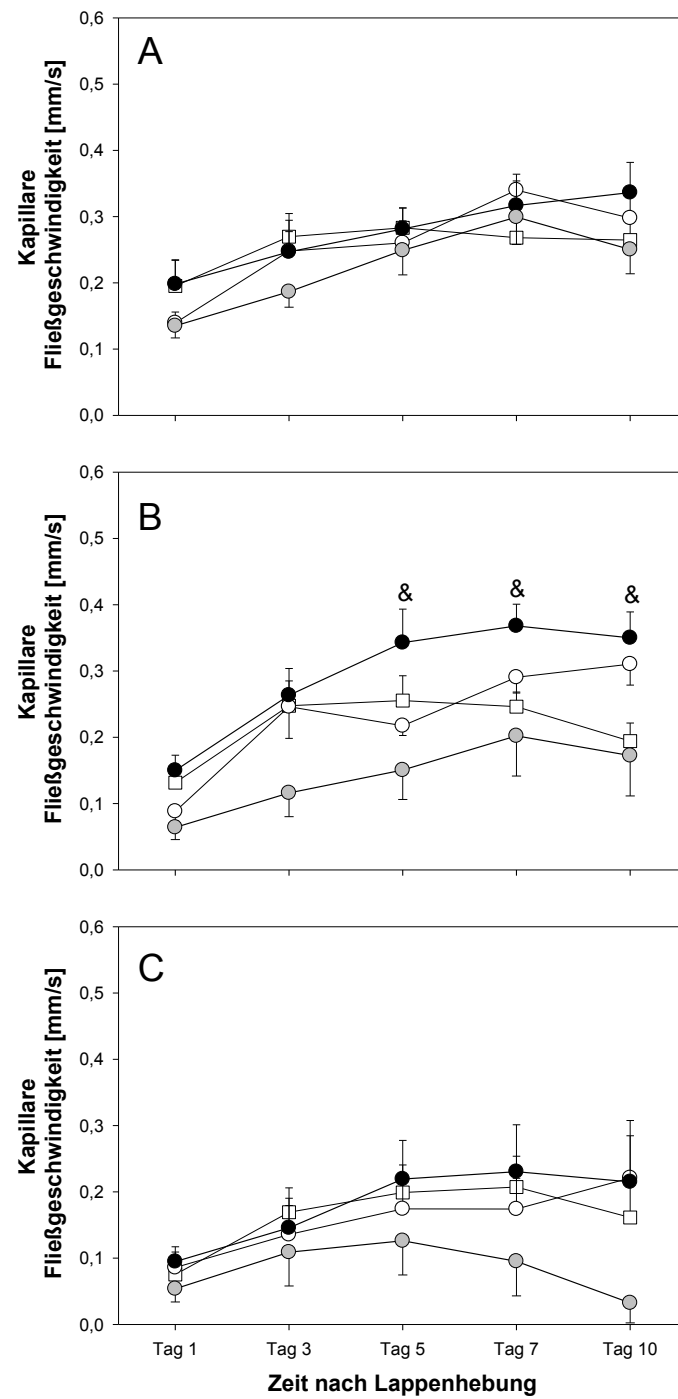


Abb. 31 : Kapillare Fließgeschwindigkeit (in mm/s) nach L-Arginin (weiße Kreise), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, [&] $p < 0,05$ vs. L-NAME.

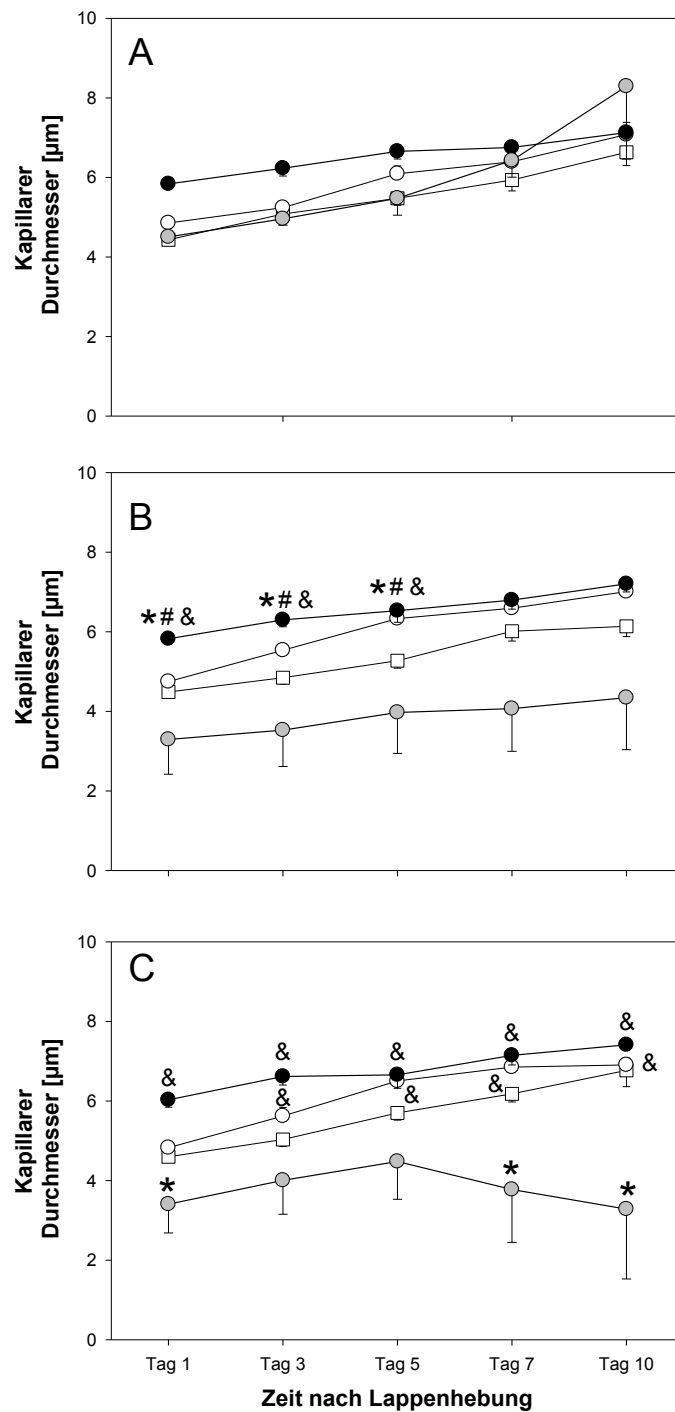


Abb. 32 : Kapillarer Durchmesser (in μm) nach L-Arginin (weiße Kreise), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * p <0,05 vs. Kontrolle, # p < 0,05 vs. L-Arginin, & p <0,05 vs. L-NAME.

6.2.10. Kapillarer Blutfluss

Als Konsequenz der kapillaren Fließgeschwindigkeit und der kapillaren Durchmesser beobachteten wir bezüglich des kapillaren Blutflusses im proximalen Lappenareal keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchs- und der Kontrollgruppe (s. Abb. 33A). In allen 4 Gruppen fand sich ein kapillarer Perfusionsanstieg um ca. 300%.

Zentral im Lappen bewirkte die Behandlung mit L-Arginin eine signifikant bessere kapillare Perfusion als die Behandlung mit L-NAME bzw. die NaCl-Behandlung der Kontrolltiere (s. Abb. 33B). Die Behandlung mit L-Arginin in der doppelten Dosierung wies im Vergleich zu den übrigen Gruppen bereits ab dem ersten Tage eine signifikant höhere kapillare Perfusion auf.

Im distalen Lappenareal fand sich ein ähnliches Bild (s. Abb. 33C) mit einer tendenziell besseren kapillaren Durchblutung im Vergleich zu den mit L-NAME behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Auch hier resultierte die Behandlung mit der doppelten Dosierung von L-Arginin im größten Anstieg der kapillaren Perfusion.

6.2.11. Funktionelle Kapillardichte

Proximal und zentral im Lappen bewirkte die Gabe von L-Arginin in der doppelten Dosierung ein Aufrechterhalten der funktionellen Kapillardichte über 10 Tage (s. Abb. 34A und B). Es zeigte sich eine signifikant höhere Kapillardichte im Vergleich den Kontrolltieren und mit den L-NAME-behandelten Tieren. L-Arginin in der einfachen Dosierung bewirkte lediglich an Tag 1 eine schlechtere Kapillardichte als die Tiere, welche die doppelte Dosis erhalten hatten. Über den Verlauf der 10 Tage kompensierten die in der einfachen Dosis behandelten Tiere diesen Ausfall und wiesen folglich eine signifikant höhere Kapillardichte als die Kontrolltiere und die mit L-NAME behandelten Tiere auf. Vor allem die Behandlung mit L-NAME resultierte in einer deutlich geringeren funktionellen Kapillardichte als bei den mit NaCl-behandelten Kontrolltieren.

Im distalen Lappenareal fand sich über den gesamten Beobachtungszeitraum bei den mit L-Arginin behandelten Tieren eine höhere Dichte funktioneller Kapillaren als in den Kontrollen und den mit L-NAME behandelten Tieren (s. Abb. 34C). Analog zu den Ergebnissen im zentralen und proximalen Areal beobachteten wir auch hier bei der Behandlung mit L-Arginin in der einfachen Dosierung an Tag 1 eine niedrigere Kapillardichte als bei den Tieren, welche die doppelte Dosierung erhielten. Dies kompensierte sich ebenfalls über die 10 Tage. Die funktionelle Kapillardichte der mit L-NAME behandelten Tiere war im Vergleich zu den Kontrollen deutlich geringer.

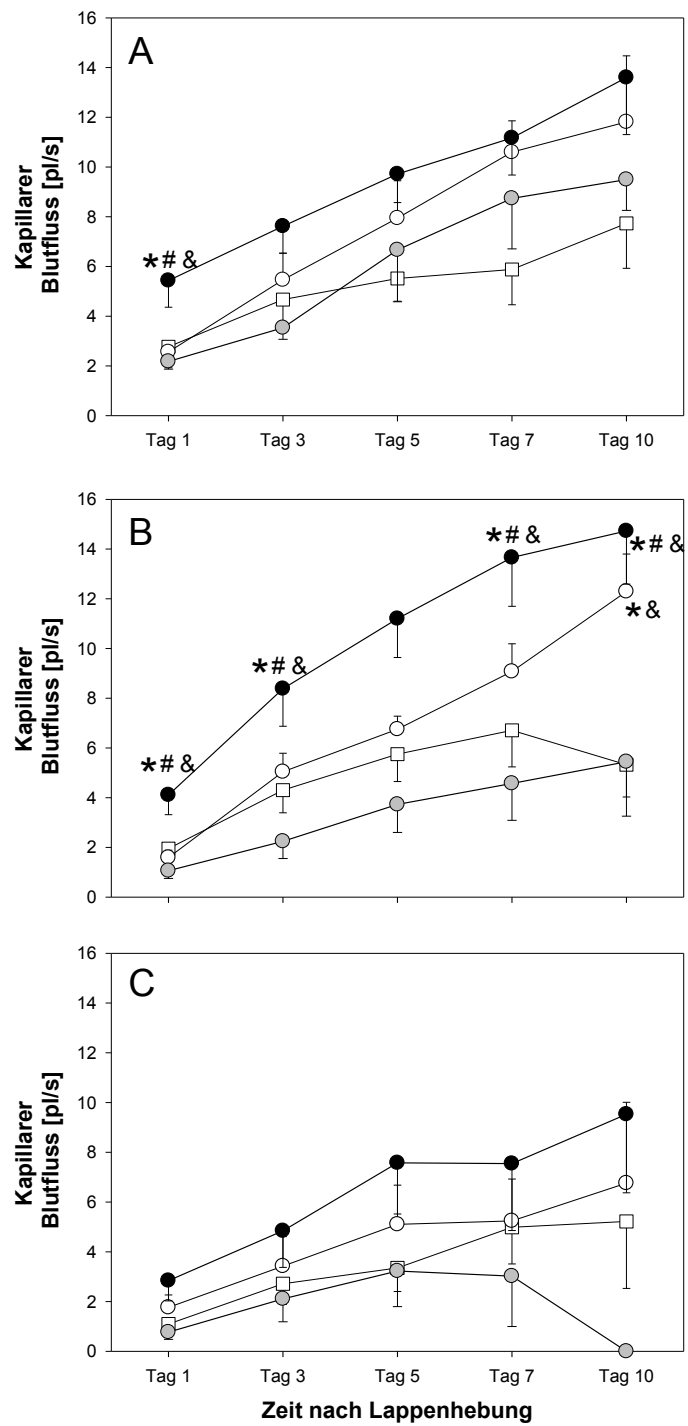


Abb. 33 : Kapillärer Blutfluss (in pl/s) nach L-Arginin (weiße Kreise), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. L-Arginin, & $p < 0,05$ vs. L-NAME.

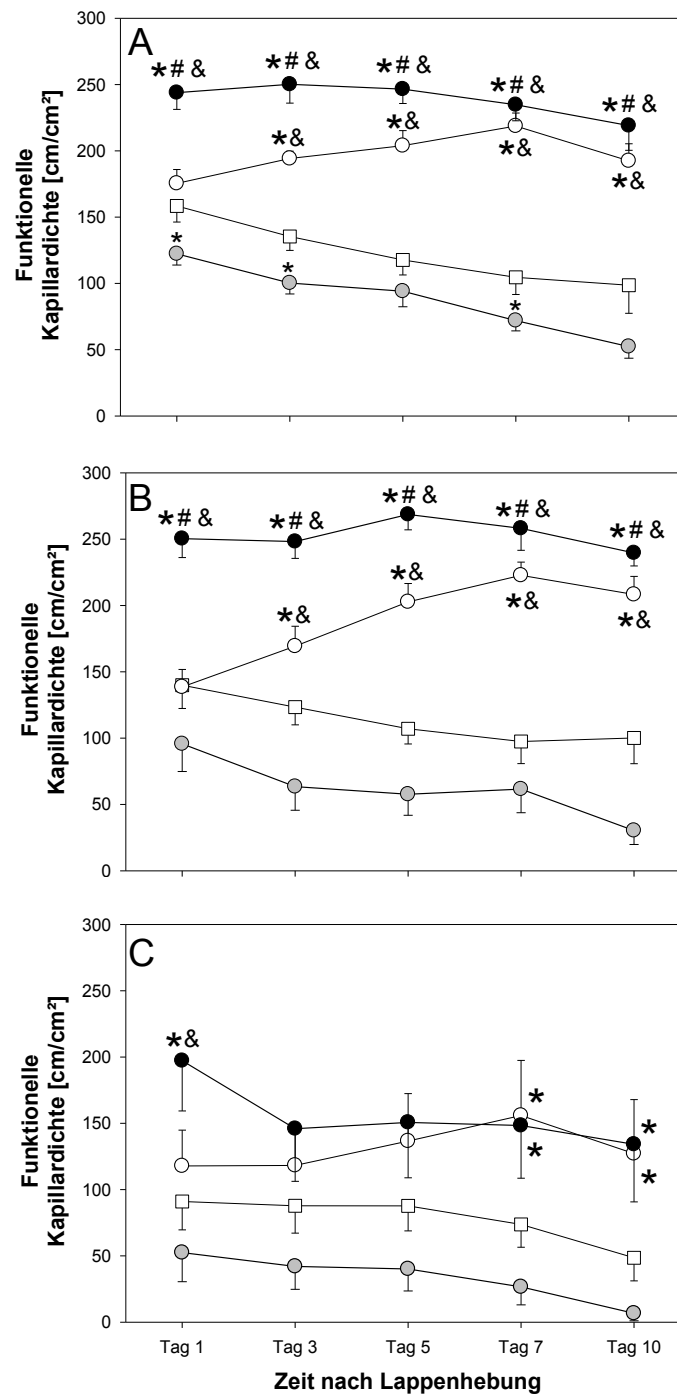


Abb. 34 : Funktionelle Kapillardichte (in cm/cm^2) nach L-Arginin (weiße Kreise), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Kreise), L-NAME (graue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (weiße Quadrate) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs., & $p < 0,05$ vs. L-NAME.

6.2.12. Apoptotischer Zelltod

Proximal und zentral im Lappen beobachteten wir im Vergleich zu den unbehandelten Tieren nach L-Arginingabe (in beiden Dosierungen) eine deutlich niedrigere Anzahl apoptotischer Zellen (s. Abb. 35A + B). Zu erwähnen ist, dass nach der Gabe von L-NAME der apoptotische Zelltod am ausgeprägtesten war.

Im distalen Lappenareal beobachteten wir ein ähnliches Bild (s. Abb. 35C). Auch hier zeigte sich bei den mit L-Arginin behandelten Tieren die niedrigste Zahl apoptotischer Zellen. Außerdem ist zu erwähnen, dass die NaCl-behandelten Tiere sowohl im proximalen als auch im zentralen Lappenareal einen deutlichen Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen aufwiesen.

6.2.13. Angiogenese

Sowohl die Vorbehandlung mit L-Arginin in beiden Dosierungen als auch die Konditionierung mit L-NAME bewirkte ebenso wie die NaCl-Behandlung der Kontrollgruppe in keinem Lappenabschnitt eine Ausbildung neuer Mikrogefäße. Es konnten zu keinem Beobachtungszeitpunkt Anzeichen für Angiogenese gefunden werden.

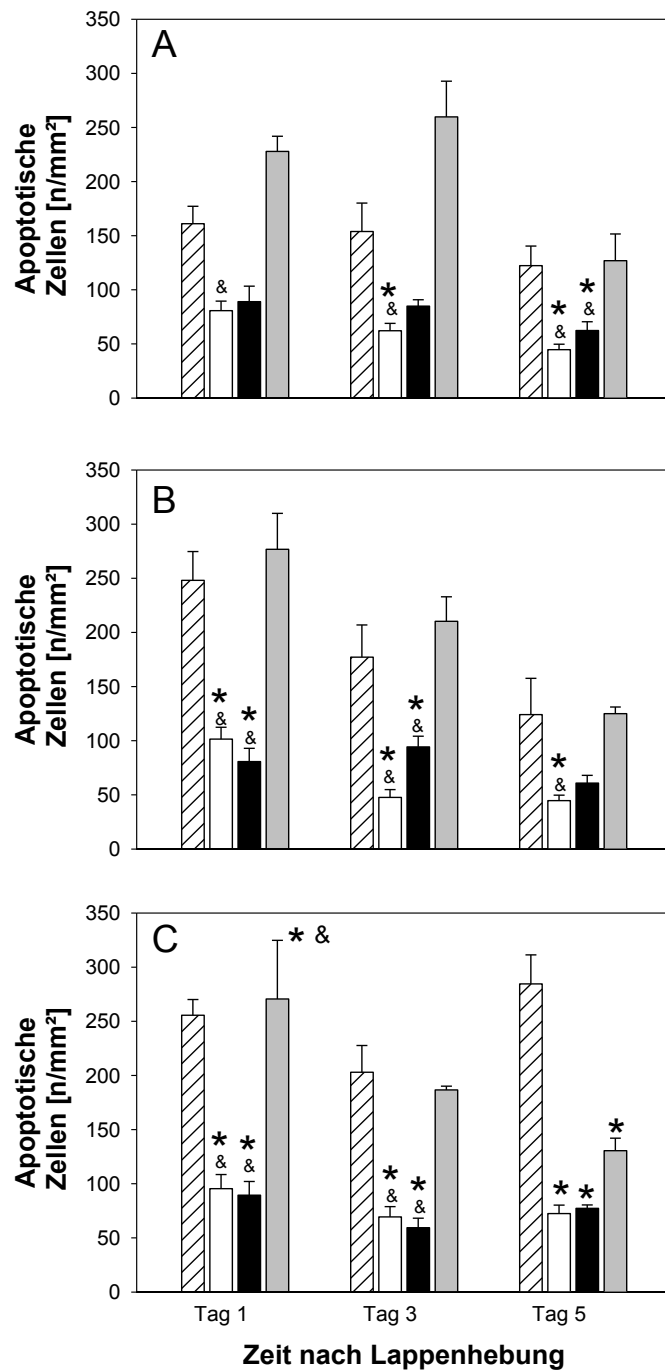


Abb. 35 : Apoptotische Zellen (in n/mm^2) nach L-Arginin (weiße Balken), L-Arginin in doppelter Dosierung (schwarze Balken), L-NAME (graue Balken) sowie nach NaCl-Behandlung (gestreifte Balken) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Abschnitt des muskulokutanen Lappens. Mittelwert + SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, & $p < 0,05$ vs. L-NAME.

7. Diskussion

7.1. Diskussion des Modells

Für die Untersuchungen verwendeten wir das etablierte Modell der chronischen Rückenhautkammer [Lehr, Leunig et al. 1993], welches modifiziert wurde [Harder, Amon et al. 2004]. Dieses seit mehreren Jahren verwendete Modell ermöglicht es mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie Untersuchungen der Mikrozirkulation durchzuführen. Beispielsweise können mit diesem Modell physiologische und pathologische Veränderungen der Mikrohämodynamik, d.h. die Perfusion in Arteriolen, Kapillaren und Venulen bzw. morphologische Veränderungen am Gefäßbett, wie Dilatation, Konstriktion, Angiogenese und Remodelling untersucht werden. Grundlage dafür ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wie beispielsweise dem Fluoreszeinisothiozyanat (FITC-Dextran), mit dem das Plasma angefärbt wird und welches so indirekt die Beobachtung von Erythrozyten (und ihrer Fließgeschwindigkeit) ermöglicht. Ein weiterer Farbstoff, Bisbenzimid, diente dazu apoptotische Zellen in vivo anzufärben, um (später) offline unter Berücksichtigung der charakteristischen Eigenschaften apoptotischer Zellkerne, wie beispielsweise der Kondensation, der Fragmentation und der Margination des Chromatins, eine Quantifizierung apoptotischer Zellen in vivo vorzunehmen. Dieser Farbstoff, welcher lokal auf den Lappen gegeben werden musste, wurde von uns nur einmalig zum Zeitpunkt der Operation gegeben, um eine weitere Manipulation am Lappengewebe sowie damit einhergehende Verfälschungen der erhobenen Daten zu verhindern.

Der Vorteil der chronischen Rückenhautkammer unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ist die Möglichkeit definierte Haut- oder Lappenabschnitte innerhalb der Rückenhautkammer repetitiv über einen längeren Beobachtungszeitraum von mehreren Tagen bzw. Wochen zu untersuchen, ohne dass die Versuchstiere in ihren Lebensgewohnheiten dabei wesentlich eingeschränkt sind.

In unserer Versuchsreihe kombinierten wir das bereits oben beschriebene Modell der Rückenhautkammer mit einem sogenannten lateral gestielten randomisiert durchbluteten Hautlappen. Dieser wurde unter Mitnahme des Panniculus Carnosus gehoben [Harder, Amon et al. 2004]. Durch die Verwendung eines in der Lappenchirurgie atypischen Länge-Breite-Verhältnis von 11mm*15mm gewährleisteten wir, dass in der NaCl-behandelten

Kontrollgruppe der Lappen unter anhaltender Ischämie über die 10 Versuchstage eine konstante Lappennekrose von rund 50 % entwickelte. Dieser Wert war innerhalb der unbehandelten Tiere trotz der randomisierten Blutzufuhr aus der Lappenbasis sehr konstant, sodass sich dieses Modell gut zum Austesten verschiedener pharmakologischer Substanzen zur Beeinflussung des Lappenüberlebens eignet. Die Gewebenekrose von rund 50 % in den mit NaCl behandelten Tieren ermöglichte somit die Analyse therapeutischer Strategien, sei es nützlich (Verminderung der Nekrose <50%) oder deletär (Zunahme der Nekrose >50%).

Gelegentlich beobachteten wir am Ende unseres Versuchs an Tag 10 nach Anbringen der Rückenhautkammer bzw. nach Lappenhebung eine mäßige Bildqualität im Vergleich zu Versuchsbeginn, welche eine Bildanalyse erschwerte. Dies ist vor allem auf das Ischämiebedingte Ödem zurückzuführen.

Durch das genaue Einhalten eines definierten Zeitfensters von mindestens 24 h zwischen dem chirurgischen Eingriff und der ersten intravitalmikroskopischen Untersuchung konnten wir sowohl die Chirurgie- als auch die Ischämiebedingte „mikrovaskuläre“ Leakage verhindern und bereits an Tag 1 des Versuchs eine gute Bildqualität gewährleisten. Jedoch beobachteten wir in der Folge hin und wieder ein Gewebeödem, welches jedoch stark von der verabreichten Substanz abhängig war.

Außerdem zeigte sich in nahezu allen Gruppen das sogenannte Phänomen des „capillary recruitment“ bei dem aufgrund des vorangegangenen Weichteiltraumas einige Kapillaren erst nach einer gewissen zeitlichen Latenz nach dem Setzen des Gewebetraumas wieder eine Perfusion aufzeigten [Amon, Laschke et al. 2006]. In dieser vorangegangenen Studie, in der das Gewebe durch einen definierten „Stoß“ traumatisiert und somit Gewebestrukturen mechanisch zerstört wurden, wurde jeweils eine Latenz von ca. 72 Stunden zwischen Kammerpräparation und erstmaliger intravitalmikroskopischer Untersuchung gewählt. In unserem Modell wählten wir aufgrund des ischämieinduzierten Ödems und dem durch die Operation vorhandenen Weichteiltrauma eine 24stündige Latenz zwischen Operation und erstmaliger Mikroskopie, um eine ausreichende Bildqualität zu garantieren. Diese ausreichende Bildqualität konnten wir in nahezu allen Versuchsgruppen sowie in der mit NaCl behandelten Gruppe beobachten.

Die Möglichkeit die von uns verwendeten Substanzen den Versuchstieren systemisch zu verabreichen und dennoch eine protektive Wirkung auf den Lappen zu erhalten stellte einen weiteren Vorteil des Modells dar. Eine lokale Injektion der Substanz direkt in den Lappenstiel konnte aufgrund der geringen Gefäßdurchmesser der für die Perfusion verantwortlichen Gefäße nicht vorgenommen werden. Außerdem wäre es nach lokaler Injektion nicht möglich gewesen, die Versuchstiere bereits im Vorfeld der Lappenhebung zu behandeln bzw. zu präkonditionieren. Diese Präkonditionierung von Gewebe stellt

jedoch gerade in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie einen interessanten therapeutischen Ansatz dar, um eine drohende Gewebeischämie zu reduzieren oder zu verhindern.

Operationen in der rekonstruktiven Chirurgie stellen in der Regel elektive Eingriffe dar, weshalb eine Präkonditionierung des zu operierenden Gewebes anzustreben ist. Entsprechend haben wir bewusst unterschiedliche Substanzen gewählt, die sowohl mit dem NO-Stoffwechsel als auch mit dem ET-Stoffwechsel interferieren. In allen Fällen wählten wir den Zeitpunkt der Substanzadministration so, dass der erwünschte protektive Effekt bereits vor Induktion der eigentlichen Ischämie eintreten konnte. Der gewählte Zeitpunkt der Gewebeprebehandlung sollte dabei 2 wesentliche Kriterien erfüllen. Zum einen berücksichtigten wir die Halbwertszeit der jeweiligen Substanz und zum anderen strebten wir eine Verabreichbarkeit mit klinischer Relevanz an. Als Versuchstier entschieden wir uns für die Maus, im Speziellen für die C57BL/6J Maus, da das Genom von Mäusen bekannt ist und so mehr Möglichkeiten für spätere Untersuchungen gegeben sind.

Weiterhin bildet die C57BL/6J Maus den Hintergrundstamm für eine Vielzahl genetisch manipulierter Mäuse, sodass für künftige Projekte eine Vergleichbarkeit gewährleistet wäre. Schließlich wiesen die von uns verwendeten C57BL/6J Mäuse im Vergleich zu Mäusen, wie der haarlosen SKH1-Maus oder der Balb-C-Maus die mit Abstand besten Hautverhältnisse auf, sodass die mikrochirurgische Präparation in reproduzierbarer Weise durchgeführt werden konnte.

Zusammenfassend bietet dieses Lappenmodell in der chronischen Rückenhautkammer eine ideale Basis um klinisch relevante Probleme, wie sie u.a. auch im klinischen Alltag bei der Verwendung von Lappenplastiken vorkommen, d.h. Wundheilungsstörung, Wunddehiszenz, Lappennekrose, etc., nachzustellen und deren pathophysiologische Ursachen mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Endothelinrezeptor-Antagonisten

Die wichtigste Erkenntnis der vorgestellten Studie ist, dass die Vorbehandlung mit einem selektiven ETB-Rezeptorblocker im Vergleich zu der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe die Lappennekrose signifikant reduzieren konnte. Erstaunlicherweise waren weder der ETA-Rezeptorblocker noch der kombinierte unspezifische ETAB-Rezeptorblocker in der

Lage die Lappennekrose wesentlich zu beeinflussen. Die ETB-Rezeptorblockade dagegen zeigte bereits am ersten Tag nach Lappenhebung, d.h. nach Induktion der Ischämie, eine signifikante Reduktion des nutritiven Perfusionsversagens in den Kapillaren [Wettstein, Morsdorf et al. 2007]. Die übrigen Gruppen dagegen zeigten keine wesentliche Veränderung der funktionellen Kapillardichte im Vergleich zu der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe.

Endothelin-1 stellt einen der potentesten Vasokonstriktoren im menschlichen Körper dar. Entsprechend würden wir durch die Blockade der ET-Rezeptoren eine Vasodilatation erwarten. Diese konnten wir jedoch in dem hier vorgestellten Modell in keiner der Versuchsgruppen in signifikantem Ausmaß beobachten. Lediglich in den mit dem selektiven ETB-Rezeptorblocker vorbehandelten Tieren beobachteten wir einen gesteigerten Gefäßdurchmesser. In den übrigen Behandlungsgruppen beobachteten wir lediglich eine geringe Zunahme der Gefäßdurchmesser. Diese Zunahme war im kritisch perfundierten Lappengewebe jedoch erst ab Tag 4 und Tag 7 zu beobachten, d.h. bereits nach vollständiger Demarkierung der Nekrose.

Dieses Ergebnis ist etwas überraschend, da bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Vasokonstriktion in Gefäßmuskelzellen in erster Linie über den ETA-Rezeptor vermittelt wird [Black, Huang et al. 2003]. Seo und Mitarbeiter konnten aufzeigen, dass die Blockierung des ETB-Rezeptors zu einer verstärkten Vasokonstriktion von Gefäßen führte [Seo, Oemar et al. 1994]. Interessanterweise konnten wir in der vorliegenden Studie aufzeigen, dass die selektive Blockade des ETB-Rezeptors zu einer deutlichen Zunahme der Gefäßdurchmesser, insbesondere in den Venulen, führte. Folglich könnte angenommen werden, dass der ETB-Rezeptor im Gegensatz zum ETA-Rezeptor vermehrt in Venulen lokalisiert ist [Ito, Katori et al. 1996; Hergenroder, Munter et al. 1998], um dann Gq-gekoppelt eine Vasokonstriktion zu induzieren. Zhang et al. konnten zeigen, dass venöse Gefäße besonders anfällig für Vasospasmus sind. Umgekehrt dilatieren diese Gefäße rasch, wenn entsprechende Maßnahmen zur Perfusionsverbesserung getroffen werden [Zhang, Lipa et al. 2000]. Diese Besonderheit könnte die ausgeprägte venuläre Dilatation nach selektiver ETB-Rezeptorblockade erklären und die damit verbundene erhöhte venuläre Drainage als Folge eines vermehrten venulären Blutflusses. Vorangegangene Studien haben bereits aufgezeigt, dass sowohl die ETA-Rezeptorblockade [Lipa, Neligan et al. 1999; Black, Huang et al. 2003] als auch die Gabe eines unspezifischen ETAB-Rezeptorblockers [Erni, Wessendorf et al. 2001] zu einem verbesserten Lappenüberleben führt. Bislang wurden jedoch keine Studien durchgeführt in denen ein direkter Vergleich der oben genannten Endothelin-Rezeptorblocker mit einem selektiven ETB-Rezeptorblocker durchgeführt wurde. Der genaue Grund, weshalb wir einen protektiven Effekt auf das Lappenüberleben ausschließlich mit dem selektiven

ETB-Rezeptorblocker beobachteten, bleibt unklar. Es kann angenommen werden, dass die von uns verwendeten Substanzen über unterschiedliche Rezeptoraffinitäten und unterschiedliche Halbwertszeiten verfügen. Über letzteres lagen uns trotz intensiver Recherche beim Produzenten keine Informationen vor. Desweiteren vertritt die aktuelle Literatur über ETB-Rezeptoren und deren Funktion sehr kontroverse Meinungen. Diese Rezeptoren, welche sowohl in Gefäßmuskelzellen als auch in Endothelzellen lokalisiert sind [Fellner and Parker 2004], können eine Vasokonstriktion, welche über die IP3-Kaskade vermittelt wird, bewirken. Andererseits vermittelt der ETB-Rezeptor eine gesteigerte Freisetzung von NO und bewirkt damit eine Gefäßdilatation [Hirata, Emori et al. 1993].

Des Weiteren konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass bei Endothelinrezeptoren eine ausgeprägte Spezies- und Organheterogenität besteht. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass am Pankreas der Ratte die Gabe eines ETA-Rezeptorblocker eine Verminderung der mikrozirkulatorischen Dysfunktion bewirkt [Plusczyk, Witzel et al. 2003]. Andere Untersuchungen an Schweinen zeigten, dass die Gabe eines kombinierten, unspezifischen ETAB-Rezeptorblockers zu einer verbesserten Oxygenierung und damit zu einem verbesserten Stoffwechsel in kritisch ischämischen Lappen führt [Erni, Wessendorf et al. 2001]. Es gilt jedoch zu erwähnen, dass diese 2 Studien im Vergleich zu den von uns durchgeführten Untersuchungen lediglich indirekte Parameter analysierten, welche Aussagen über die Gewebepfusion machen konnten. Eine direkte Darstellung des Gefäßsystems und somit der Mikrozirkulation, wie sie in unserem Versuch aufgrund der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht wurde, war in dem von Erni et al. durchgeführten Modell nicht möglich.

Weiter zeigten Inoue et al. an der Haut der Ratte, dass die Gabe eines selektiven ETA-Rezeptorblockers ein verbessertes Lappenüberleben bewirkt [Inoue, Aihara et al. 1998]. Diese Beobachtung teilen Black und Mitarbeiter, die in ihren Versuchen aufzeigten konnten, dass die Gefäßkonstriktion ausschließlich über ETA-Rezeptoren vermittelt wird [Black, Huang et al. 2003]. Lipa et al. konnten jedoch nachweisen, dass die endothelinvermittelte Vasokonstriktion an der Haut sowohl von ETA- als auch von ETB-Rezeptoren abhängt [Lipa, Neligan et al. 1999]. Halcox und Mitarbeiter konnten ebenfalls nachweisen, dass die Blockade beider ET-Rezeptoren zu einer Vasodilatation humaner Koronarien und damit zu einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion führte. Die selektive ETB-Rezeptorblockade bewirkte teilweise jedoch auch eine Vasokonstriktion. [Halcox, Nour et al. 2007].

Die Literatur zeigt, dass die selektive Funktion der einzelnen ET-Rezeptoren bis zum heutigen Tag nicht eindeutig geklärt ist.

Insgesamt existieren nur sehr wenige Studien, die einen direkten Vergleich der einzelnen Rezeptorsubtypen untersuchten. Die meisten Studien vergleichen zwischen einem selektiven ETA-Rezeptorblocker und dem kombinierten ETAB-Rezeptorblocker. Obwohl die vorliegende Studie sowohl die selektiven ETA- und ETB-Rezeptorblocker sowie den unspezifischen ETAB-Rezeptorblocker in kritisch perfundiertem Gewebe vergleichend untersuchte, müssen wir davon ausgehen, dass in muskulokutanem Gewebe der Maus die Protektion über den ETB-Rezeptor und nicht über den ETA-Rezeptor vermittelt wird.

Obwohl wir wissen, dass Endothelin bei der arteriellen Hypertonie eine entscheidende Rolle spielt [Saito, Nakao et al. 1990], müssen wir davon ausgehen, dass die ET-Rezeptorblockade, insbesondere des ETB-Rezeptors, einen wesentlichen Einfluss auf den systemischen Blutdruck haben kann, denn die arterioläre und somit auch die kapillare Perfusion konnten verbessert werden. Rooks et al. konnten bereits aufzeigen, dass eine Hyperperfusion auf das Lappenüberleben eine protektive Wirkung haben kann [Rooks, Gould et al. 1991]. Genau diese Hyperperfusion beobachteten wir v.a. in den mit dem ETB-Rezeptorblocker vorbehandelten Tieren.

Weiter ist zu erwähnen, dass in keiner Versuchsgruppe, inkl. der unbehandelten Kontrollen, Anzeichen von Angiogenese, wie beispielsweise Gefäßknospen und Gefäßsprossungen, beobachtet werden konnten, obwohl die untersuchten Tiere einer anhaltenden Ischämie unterlagen. Diese anhaltende Ischämie stellt einen der ausgeprägtesten Stimulatoren der Angiogenese [Ziche, Morbidelli et al. 1996] dar. In Tumoren, wie z.B. dem Meningeom, konnte nachgewiesen werden, dass Endothelin bei der Tumorangiogenese eine wesentliche Rolle spielt [Boldrini, Pistolesi et al. 2006]. An Karzinomzellen des Brustkrebs konnte nachgewiesen werden, dass eine vermehrte Expression von Endothelin, ETA- und ETB-Rezeptoren mit einer erhöhten VEGF-Konzentration einhergeht. Die Folge war eine vermehrte Vaskularisierung. Diese Daten zeigen eindeutig, dass Endothelin und seine Rezeptoren bei der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen [Wulfig, Kersting et al. 2004]. Umgekehrt ist es nachvollziehbar, dass die Blockade der unterschiedlichen Endothelinrezeptoren zu einem Ausbleiben der Angiogenese führt. Daher wurde in der Vergangenheit auch schon versucht das Tumorwachstum mittels unterschiedlicher ET-Rezeptorblocker zu reduzieren, wie beispielsweise Bagnato und Mitarbeitern, die nachweisen konnten, dass eine selektive ETA-Rezeptorblockade die Neovaskularisation von Tumorzellwachstum inhibieren kann [Bagnato and Spinella 2003]. Weiter wurde nachgewiesen, dass die kombinierte ETAB-Rezeptorblockade mit Bosentan in einem Hamstermodell die Dichte neugebildeter Gefäße, welche durch Endothelin induziert wurde, reduzieren konnte [Cruz, Parnot et al. 2001]. Des Weiteren konnten vergangene Studien zeigen, dass die Inhibition von ETB-Rezeptoren bei Melanomzellen zu einer erhöhten Freisetzung von VEGF führt. Letzteres

verfügt über zahlreiche angiogene Eigenschaften [Lahav, Suva et al. 2004]. Folglich könnte die in unserem Modell gewählte selektive Blockade des ETB-Rezeptors über die Expression von VEGF ebenfalls angiogene Eigenschaften bewirken, was unter anderem die signifikant höhere funktionelle Kapillardichte erklären könnte.

Im Rahmen einer nicht tumoralen Erkrankung konnte nachgewiesen werden, dass die selektive Blockade des ETA-Rezeptors die Angiogenese in Folge einer subarachnoidalen Blutung reduzieren konnte [Josko, Hendryk et al. 2001]. Der ETB-Rezeptor nimmt ebenfalls an der Vermittlung von Angiogenese teil, denn Goligorsky und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass dieser Rezeptor zu einem Anstieg von NO führt. NO wiederum induziert Gefäßneubildung. Die selektive ETB-Rezeptorblockade konnte die Endothelin-vermittelte Angiogenese in Ovarialzellen von Hamstern vollständig hemmen [Goligorsky, Budzikowski et al. 1999].

Da jedoch in dem hier verwendeten Modell auch in der mit NaCl-behandelten Kontrollgruppe keinerlei Anzeichen einer Angiogenese beobachtet wurden, muss das Ausbleiben der Gefäßneubildung in den Behandlungsgruppen nicht substanzspezifisch sein. Einer der stärksten Stimuli der Angiogenese, die anhaltende Hypoxie, liegt in allen untersuchten Gruppen vor, insbesondere im Bereich der sogenannten Demarkationszone, zwischen dem gut durchbluteten vitalen proximalen Lappenareal und dem nicht perfundierten nekrotischen Anteil. Das Ausbleiben der Gefäßneubildung, welche wir ungefähr ab dem 3. Tag nach Lappenhebung, d.h. Induktion der Ischämie, erwarten würden, könnte damit erklärt werden, dass die Angiogenese ein aktiver Prozess ist, der sich nur in durchblutetem Gewebe entwickeln kann. Da jedoch in diesem Modell bereits ab dem dritten Tag oder spätestens ab dem fünften Tag nach Lappenhebung die Nekrose vollständig demarkiert, können neugebildete Gefäße das nekrotische Gewebe nicht mehr integrieren.

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die selektive Blockade des ETB-Rezeptors einen antiapoptotischen Effekt vermittelt. Die selektive ETB-Rezeptorblockade führte in allen Lappenarealen, d.h. proximal, zentral und distal, zu sämtlichen Beobachtungszeitpunkten zu einer signifikanten Verminderung des apoptotischen Zelltodes. Die Tatsache, dass die Apoptose in allen Lappenarealen vermindert war, obwohl die funktionelle Kapillardichte nach selektiver ETB-Rezeptorblockade im Vergleich zu den NaCl behandelten Kontrollen und der ETA- und ETAB-Rezeptorblockade lediglich zentral und v.a. distal im Lappen erhöht war, weist darauf hin, dass die selektive ETB-Rezeptorblockade einen direkten antiapoptotischen Effekt vermittelt.

Vorliegende Studien haben einen antiapoptotischen Effekt für Endothelin-1 selbst nachgewiesen, wie beispielsweise Dong und Mitarbeiter, welche an menschlichen Umbilicalvenen den Einfluss von Endothelin auf den oxidativen Stress und den

apoptotischen Zelltod untersuchten. Sie konnten nachweisen, dass Endothelin an der Bildung von radikalen Sauerstoffspezies beteiligt ist und über den ETB-Rezeptor den durch Homocystein induzierten apoptotischen Zelltod reduzieren vermag [Dong, Zhang et al. 2005]. Interessanterweise würde dieser Wirkmechanismus für unsere Versuchsanordnung bedeuten, dass die spezifische ETB-Rezeptorblockade zu einem Anstieg des apoptotischen Zelltodes führen würde. Entsprechend gehen wir eher davon aus, dass analog zu Cattaruzza et al. Endothelin über den ETB-Rezeptor zu einer Induktion der Apoptose führt. Die Gabe des selektiven ETB-Rezeptorblockers BQ-788 konnte den Endothelin-vermittelten Effekt nahezu vollständig supprimieren. Erstaunlicherweise war der selektive ETA-Rezeptorblocker BQ-123 nicht in der Lage den endothelininduzierten programmierten Zelltod zu verhindern [Cattaruzza, Dimigen et al. 2000].

Weiter konnte in früheren Studien beobachtet werden, dass auch die kombinierte Blockade mittels ETAB-Rezeptorblocker in der Lage war über eine Suppression der NO-Synthase den apoptotischen Zelltod zu hemmen [Shaw, Shennib et al. 2001]. Da eine Vielfalt von Studien den Einfluss von Endothelin vermittelter Induktion des apoptotischen Zelltodes beschreiben, kann man in Bezug auf unser Versuchsmodell einen direkten ETB-Rezeptorblocker vermittelten antiapoptotischen Effekt postulieren. Allerdings darf man nicht außer Acht lassen, dass eine erhebliche Heterogenität bzgl. der untersuchten Spezies und der Gewebe vorliegt, d.h. die oben erwähnten Studien wurden z.T. an Menschen, an Ratten [Shichiri, Marumo et al. 1998; Cattaruzza, Dimigen et al. 2000] oder aber am Kaninchen [Shaw, Shennib et al. 2001] durchgeführt.

7.2.2. NO Induktion und Inhibition

Die primäre Erkenntnis unserer Versuchsreihe ist, dass die Behandlung mit dem NO-Donor L-Arginin die Nekrose in kritisch ischämischem Lappengewebe zu reduzieren vermag. Dabei ist zu erwähnen, dass die Gabe von L-Arginin in doppelter Dosierung von 20 mg/kg KG bereits am ersten Versuchstag, d.h. an Tag 1 nach Lappenhebung, den mikrozirkulatorischen Perfusionsausfall verringern konnte. Die Gabe von 10 mg/kg KG L-Arginin zeigte zum gleichen Zeitpunkt gegenüber der unbehandelten Kontrolle keine Veränderung der Mikrozirkulation. Trotz des initial unterschiedlichen Perfusionsausfalls an Tag 1 beobachteten wir in beiden mit L-Arginin behandelten Versuchsgruppen über die 10 Tage einen deutlichen Rückgang des Perfusionsausfalls und damit schlussendlich der Gewebenekrose auf ca. 35 % gegenüber 48% bei den mit NaCl behandelten

Kontrolltieren. Dieser Effekt zeigte sich unabhängig von der verabreichten L-Arginin-Dosis.

Diese Ergebnisse sollen die protektiven Eigenschaften von L-Arginin und dem aus ihm gebildeten NO im Rahmen anhaltender Ischämie verdeutlichen. Die Verabreichung von L-Arginin hat bereits protektive Effekte im Rahmen der Wundheilung, Immunmodulation [Wu, Meininger et al. 2000] [Chow, Fox et al. 1998], Knochenheilung [Chow, Fox et al. 1998] und der endothelialen Dysfunktion bei Tieren, welche an Hypercholesterinämie litten, gezeigt [Nakai, Voisine et al. 2005]. Im Bezug auf das Haut-Muskelgewebe wurde unter anderem nachgewiesen, dass L-Arginin in der Lage ist eine Lappennekrose zu reduzieren, sei es nach einem Ischämie-Reperfusions-Schaden [Meldrum, Stephenson et al. 1999] oder aber im Rahmen eines rein venös perfundierten Lappens [Ozyazgan, Ozkose et al. 2007]. Das verbesserte Lappenüberleben war dabei die Folge einer L-Arginin abhängigen NO-Freisetzung. L-Arginin wurde dabei erst nach Induktion der Ischämie verabreicht. Daneben wurde in der Vergangenheit auch eine Reduktion der nekrotischen Gewebefläche bei epigastrischen Hautlappen nach L-Arginin-Gabe beobachtet, welche ähnlich unserem Modell unter einer anhaltenden Ischämie standen [Komorowska-Timek, Timek et al. 2004]. Diese Effekte waren jedoch alle lediglich im Rahmen einer Behandlung zu beobachten, d.h. L-Arginin wurde erst verabreicht, nachdem die pathophysiologischen Veränderungen eingetreten waren. Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, wie L-Arginin den Lappen vor Ischämie und Gewebedestruktion schützt, z.B. die gut erforschte L-Arginin-vermittelte NO-Freisetzung [Palmer, Ashton et al. 1988] oder aber ein L-Arginin vermittelter antioxidativer Effekt [Um, Suzuki et al. 1998]. Aber auch eine gesteigerte Insulinsekretion wird ebenso wie ein verminderter Noradrenalineffekt und eine damit verbundene Vasodilatation diskutiert [Loscalzo 2004].

Auch die kompetitive Hemmung von endogenem ADMA, d.h. asymmetrischem Dimethylarginin, einem endogenen Inhibitor der NO-Synthase, welcher der NO-Produktion entgegenwirkt und somit eine lokale Vasokonstriktion auslöst [Boger 2004] kommt als protektiver Effekt der L-Arginin-Gabe in Frage.

Interessanterweise konnte die Vorbehandlung mit L-Arginin die Lappennekrose um lediglich 10 % verbessern, unabhängig ob in einfacher oder doppelter Dosierung verabreicht. Im Wissen, dass es sich bei L-Arginin um einen äußerst potenten Vasodilatator handelt, insbesondere unter ischämischen Bedingungen, kann es neben der oben genannten protektiven Wirkung jedoch auch zu einer Nebenwirkung der freien NO-Produktion kommen. Dazu gehört beispielsweise die Bildung zytotoxischer Substanzen [Um, Suzuki et al. 1998]. Bei Vorhandensein von Superoxid wird das zellschädigende Peroxynitrit freigesetzt. Außerdem kann es durch freigesetztes NO zur zytotoxischen

Makrophagen-Aktivierung kommen. Die aktivierten Makrophagen zerstören dabei nicht nur Bakterien und Tumorzellen, sondern auch normales Gewebe.

In unserer Studie beobachteten wir nach Gabe von L-NAME einen höheren Perfusionsausfall der funktionellen Kapillardichte im Vergleich zu den mit L-Arginin vorbehandelten Gruppen. Entsprechend führte L-NAME zu einer vermehrten Gewebenekrose, welche auf die kompetitive Blockade der NO-Synthase durch L-NAME zurückzuführen ist.

Die Tatsache, dass die Nekrose mit 66% nach L-NAME-Gabe deutlich höher ausfällt als in den mit NaCl behandelten Kontrollen (48% Nekrose) weist darauf hin, dass L-NAME der ischämieinduzierten NO-Produktion entgegenwirkt und somit sowohl den exogenen als auch den endogenen NO-Stoffwechsel beeinflusst.

Ursache der vermehrten Lappennekrose ist die Vasokonstriktion der zuführenden Lappengefäße. Dadurch kann die Mikroperfusion auf Kapillarebene nicht mehr gewährleistet werden. Dies resultiert schließlich in einem signifikant geringeren Überleben des Lappens.

Vorrangegangene Studien konnten den negativen Einfluss von L-NAME in verschiedenen pathophysiologischen Gegebenheiten, wie z.B. in einem experimentellen Modell der Sepsis oder der myokardialen Ischämie bereits nachweisen. Die Blockade der NO-Synthase mit L-NAME führte hier zu einer erhöhten Mortalität [Lopez, Lorente et al. 2004] bzw. einer erhöhten Schlaganfallrate [Liu, Xu et al. 2002].

Auch experimentelle Haut-Muskellappen zeigten nach L-NAME-Gabe eine Zunahme der Lappennekrose [Komorowska-Timek, Timek et al. 2004]. McDonald et al. konnten in vorrangegangenen Studien aufzeigen, dass die L-NAME-Gabe mit einer verminderten Gefäßdilatation einherging, was letztendlich zu einem Rückgang der Lappenperfusion und somit zu einer vermehrten Lappennekrose führte [McDonald, Lo et al. 2004].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Einfluss von L-Arginin bzw. L-NAME auf den Blutdruck der Versuchstiere. Es ist davon auszugehen, dass ein erhöhter Blutdruck auf eine vermehrte periphere Vasokonstriktion zurückzuführen ist. Aus älteren Studien ist bekannt, dass die Gabe von L-NAME zu einem Anstieg des arteriellen Blutdruck führt [Wang, Wang et al. 2002; Gokce 2004]. Gleichzeitig war das „Outcome“ nach L-NAME-Gabe verschlechtert, was unter anderem dafür spricht, dass die durch L-NAME verursachte vermehrte periphere Vasokonstriktion einen negativen Einfluss auf das Lappenüberleben hat. In einem Modell am Hund bzw. einem Modell an der Ratte konnte bereits mehrfach eine Zunahme des peripheren Widerstandes [Alemayehu, Lock et al. 1994] sowie eine Hypertonieinduktion nach L-NAME-Gabe beobachtet werden [De Angelis, Ogawa et al. 2006].

Mit anderen Worten kann postuliert werden, dass die NO-assoziierte Vasodilatation und somit folgende Blutdrucksenkung keinen negativen Einfluss auf das Lappenüberleben hat. Leider ermöglichte das hier vorgestellte Mausmodell keine kontinuierliche Blutdruckmessung über den Versuchszeitraum von 10 Tagen. Jedoch existieren einige Studien, die nachweisen konnten, dass die Gabe von L-Arginin zu einer Reduktion des arteriellen Druck führt [Bode-Boger, Boger et al. 1998; Gokce 2004]. Außerdem konnte nach Gabe von L-Arginin bereits mehrfach ein Benefit für Hypertoniepatienten [Gokce 2004] nachgewiesen werden, welcher durch eine deutliche Blutdrucksenkung verursacht ist. Im Gegensatz dazu konnte in einem Hundemodell bereits mehrfach eine Zunahme des peripheren Widerstandes [Alemayehu, Lock et al. 1994] sowie an Ratten eine Hypertonieinduktion nach L-NAME-Gabe beobachtet werden [De Angelis, Ogawa et al. 2006].

Weiter wollten wir in unserem Versuch den Einfluss des NO-Donators L-Arginin auf den Gefäßdurchmesser untersuchen. Zunächst beobachteten wir eine Erweiterung der arteriolen Durchmesser bei allen Tieren, welche mit L-Arginin vorbehandelt wurden. Bode-Boger et al. konnten am Menschen nachweisen, dass die Verabreichung von L-Arginin zu einer direkten Vasodilatation führt, welche eng mit der Plasmakonzentration von L-Arginin korrelierte [Bode-Boger, Boger et al. 1998]. Diesen konzentrationsabhängigen Effekt konnten wir jedoch in unserer Versuchsanordnung nicht nachweisen. Der arteriolen Gefäßdurchmesser zeigte keinen Unterschied, unabhängig davon ob L-Arginin in einfacher oder doppelter Dosierung verabreicht wurde. Interessanterweise beobachteten wir ebenfalls in den mit NaCl behandelten Kontrollgruppen und in der mit L-NAME vorbehandelten Gruppe eine Zunahme der arteriolen Durchmesser in allen 3 Lappenanteilen über die 10 Tage Beobachtungszeitraum. Allerdings erwarteten wir aufgrund der von uns vorgestellten Wirkungshypothese von L-NAME, der kompetitiven Hemmung der NO-Synthase, in dieser Versuchsgruppe eher eine Vasokonstriktion.

Die Tatsache, dass wir in diesem Modell nach L-NAME-Gabe in den Arteriolen keine Vasokonstriktion beobachten konnten, ist nicht unwahrscheinlich auf die anhaltende Ischämie im Lappengewebe zurückzuführen. Diese Ischämie stellt einen äußerst starken Reiz zur Erweiterung der Gefäßdurchmesser dar, da das kritisch perfundierte Lappengewebe stets versucht, die unzureichende Blutzufuhr durch Vasodilatation, d.h. durch Vermehrung der potentiellen endothelialen Austauschfläche zwischen Blutgefäß und Interstitium, zu kompensieren [Harder, Amon et al. 2005]. Somit ist der dilatatorische Reiz durch Ischämie in Arteriolen stärker als die kompetitive Blockade der NO-Synthase durch L-NAME oder aber über einen anderen Mechanismus als die NO-Synthase induziert. Die Ischämie-induzierte arteriolen Dilatation konnte am besten in den mit NaCl

behandelten Kontrollen beobachtet werden. Insgesamt war diese Dilatation in der Kontrollgruppe jedoch geringer als die Kombination von anhaltender Ischämie und Gabe von L-Arginin. Es gilt zu erwähnen, dass das vorliegende Modell keine eigentliche Baseline ermöglicht, an der die Gefäße vor Lappenhebung untersucht werden, wie dies beispielsweise in einer normalen Rückenhautkammer ohne Lappen möglich ist. Zur Vergleichbarkeit wurden jedoch in allen Versuchsgruppen stets Arteriolen der 1. Generation untersucht.

Während der Versuchsperiode zeigte sich in den postkapillaren Venulen ein vergleichbares Bild wie in den Arteriolen. Auch hier beobachteten wir eine zunehmende Gefäßdilatation. Die Vorbehandlung mit L-Arginin resultierte jedoch in einer stärkeren Dilatation im Vergleich zu den übrigen Versuchsgruppen. Ein dosisabhängiger Effekt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Vorbehandlung mit L-NAME bewirkte in den Venulen im Vergleich zu den Arteriolen ebenfalls eine diskret stärkere Dilatation, insbesondere im distalen Lappenareal. Gründe dafür könnten das bessere Ansprechen des Endothels auf die NO-Synthase sein [Ozyazgan, Ozkose et al. 2007]. Weiter kann man sich vorstellen, dass die Venulen, welche im Gegensatz zu den Arteriolen über keine Muscularis verfügen, vermehrt einer Blutfluss- und blutdruckabhängigen passiven Gefäßdilatation unterliegen [Mitchell, Yu et al. 1997].

Im Kapillarbett beobachteten wir wie auch in den postkapillaren Venulen eine vermehrte Dilatation im Vergleich zu den Arteriolen. Interessanterweise hat auch die Blockade der NO-Synthase mittels L-NAME ebenfalls zu einer verhältnismäßig ausgeprägten Vasokonstriktion in allen drei Lappenanteilen geführt. Ob diese variierenden Durchmesser in Kapillaren eine Folge eines aktiven, NO-abhängigen [McDonald, Lo et al. 2004] oder eines passiven, blutflussabhängigen, Phänomens [Amon, Menger et al. 2003] sind, können wir mit den uns vorliegenden Daten jedoch nicht klären.

Ob Kapillaren in der Lage sind, aktiv zu dilatieren oder ihre Dilatation eine passive Antwort auf den erhöhten arteriellen Blutfluss ist, ist bislang noch nicht endgültig geklärt [Mitchell, Yu et al. 1997].

Eine weitere interessante Beobachtung dieser Studie war die Tatsache, dass die Behandlung mit L-Arginin in allen drei Lappenanteilen zu einer signifikanten Reduktion des apoptotischen Zelltodes führte, die unabhängig von der verabreichten L-Arginin Dosis war. Diese Beobachtung steht in Widerspruch mit anderen Arbeitsgruppen hinsichtlich der Wirkung von L-Arginin und der damit verbundenen NO-Freisetzung auf den apoptotischen Zelltod. In der Vergangenheit wurde bereits mehrfach aufgezeigt, dass die Substitution von L-Arginin und die daraus resultierende NO-Freisetzung mit einem vermehrten apoptotischen Zelltod einhergeht, wie z.B. in einem experimentellen Modell der pulmonalen Hypertonie an Hühnern. Die Gabe von L-Arginin führte zu einer Erhöhung des

NO-Spiegel, welche mit einer Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen einherging [Tan, Pan et al. 2005]. Weiter konnten Niebauer et al. in einem Modell der Ballondilatation am Kaninchen den Zusammenhang zwischen NO-Freisetzung durch L-Arginin und Induktion des apoptotischen Zelltodes nachweisen, indem die lokal gesteigerte Gewebekonzentrationen von L-Arginin zu einer verstärkten Bindung von Monozyten und gleichzeitig zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen führte [Niebauer, Schwarzacher et al. 1999].

Die Tatsache, dass im vorliegenden Modell der apoptotische Zelltod nach Gabe von L-Arginin gegenüber NaCl-behandelten Kontrollen und mit L-NAME-behandelten Lappen signifikant reduziert war, kann zwei unterschiedliche Gründe haben: 1. Die Vorbehandlung mit L-Arginin zeigte eine signifikant verbesserte nutritive Kapillarperfusion, die direkt und ohne NO-abhängigen Mechanismus für die verminderte Zellapoptose verantwortlich ist. 2. In einem Modell der abdominalen Infektion an der Ratte wurde nachgewiesen, dass die Behandlung von intestinalen Epithelzellen mit L-Arginin zu einer Reduktion der Apoptose führt [Wu, Ren et al. 2007]. In einem speziellen Zelltyp von Nb2 Lymphomzellen führte die Gabe von L-Arginin zu einer Erhöhung der NO-Konzentration, was zu einer NO-vermittelten Hemmung des apoptotischen Zelltodes führte [Dodd, Limoges et al. 2000]. Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass NO den UVA-induzierten apoptotischen Zelltod über eine Hochregulation von Bcl-2 (in den Keratozyten) hemmt [Suschek, Krischel et al. 1999]. Entsprechend war aus unseren Ergebnissen zu erwarten, dass die Gabe von L-NAME zu einem vermehrten apoptotischen Zelltod führen würde. In der Tat beobachteten wir in allen drei Lappenanteilen eine deutliche Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrolltieren und zu den mit L-Arginin-vorbehandelten Gruppen. Die Literatur ist diesbezüglich wiederum sehr widersprüchlich. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von L-NAME und somit die Hemmung der NO-Synthase wiederholt zu einer Verringerung des apoptotischen Zelltodes führt, wie z.B. bei Keimzellen von Kaninchenhoden [Nucci, Piccirilli et al. 1996] oder von Rattenhoden [Gao, Yang et al. 2003]. Watanabe und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass die Verabreichung von L-NAME an der Rattenniere zu einem erhöhten Apoptose-Index glomerulärer Zellen führt, d.h. die Hemmung des NO-Systems führte zu einer Induktion des apoptotischen Zelltodes [Watanabe, Ono et al. 2000]. Ebenfalls in der Ratte konnten Liu et al. nachweisen, dass die Gabe von L-NAME die Apoptose von Kardiomyozyten signifikant erhöhte, was wohl als Folge eines no-reflow-Phänomens durch Ischämie/Reperfusion anzusehen ist [Liu, Xu et al. 2002]. Ob in unserer Versuchsanordnung andere Mechanismen als die durch L-NAME-Gabe signifikant reduzierte funktionelle Kapillardichte und somit die daraus folgende Ischämie des Lappens eine Rolle spielen, kann nicht sicher beantwortet werden.

Eine weitere Beobachtung, die erwähnenswert ist, ist die Tatsache, dass in keiner der Versuchsgruppen, Kontrollgruppen inklusive, klassische Zeichen der Angiogenese, wie beispielsweise die Bildung von Gefäßsprossen oder Gefäßknospen, nachgewiesen werden konnten. Dies ist umso erstaunlicher, da die Lappen einer anhaltenden Ischämie ausgesetzt waren, was einem der stärksten Stimulatoren der Angiogenese entspricht. So ist doch bekannt, dass vermehrtes L-Arginin und somit erhöhte NO-Spiegel für die Angiogenese von Melanomen verantwortlich gemacht werden [Joshi 1997]. Weiter wurde nachgewiesen, dass die Gabe von L-Arginin die Expression von VEGF, einem bedeutenden angiogenen Faktor, induziert [Suzuki 2005; Suzuki 2006]. In Untersuchungen an einem axial gestielten epigastrischen Lappen an der Ratte führte die Gabe von L-Arginin zu erhöhten NO-Spiegeln. Gleichzeitig wurden erhöhte VEGF-Spiegel beobachtet, die mit der Induktion von Angiogenese einhergingen und somit in der Lage waren, die Lappennekrose deutlich zu reduzieren [Komorowska-Timek, Timek et al. 2004]. L-Arginin, der Induktor der NO-Synthase wird nicht nur in Verbindung gebracht mit verstärkter Expression von VEGF sondern auch mit der Bereitstellung von Fibroblasten basischem Wachstumsfaktor 2 (bFGF2). Dieser Faktor, der für die Angiogenese ebenfalls essentiell ist, konnte die endotheliale Dysfunktion verringern, was eine Folge von L-Arginin-Gabe und der damit erhöhten NO-Verfügbarkeit war [Voisine, Li et al. 2005].

Der Grund, weshalb wir trotz der beschriebenen proangiogenen Eigenschaften von L-Arginin keinerlei Anzeichen für Angiogenese nachweisen konnten, kann eine Folge des Modells sein. Die Lappennekrose war bereits nach dem dritten bzw. spätestens nach dem fünften Versuchstag nach Lappenhebung vollständig demarkiert. Da für die Neubildung von Gefäßen, d.h. die Angiogenese, aktive Stoffwechselvorgänge wie beispielsweise Leukozytenmigration, Leukozytenextravasation, etc. essentielle Voraussetzungen sind, kann die rasch eintretende definitive Demarkierung zwischen vitalem Gewebe proximal und nekrotischem Gewebe distal für ein Ausbleiben der Angiogenese verantwortlich sein. Weiter kann es möglich sein, dass die verabreichte Dosis von L-Arginin ebenso wie die doppelte Dosis nicht ausreicht, um gemeinsam mit der Ischämie einen Reiz für die Neubildung von Mikrogefäßen darzustellen.

Anders stellt sich das Ausbleiben der Angiogenese in der L-NAME-Gruppe dar. Hier lag zwar auch bereits ab dem ersten Versuchstag nach Lappenhebung als Folge des signifikanten Perfusionsausfalls die Hypoxie als starker Stimulus zur Ausbildung neuer Gefäße vor, jedoch wird in der Literatur L-NAME aufgrund der fehlenden Bereitstellung von NO keinerlei Eigenschaft zur Angiogenese-Induktion zugeschrieben. So konnte beispielsweise in einem Tumormodell nachgewiesen werden, dass die Gabe von L-NAME zu einer deutlich geringeren Metastasierungsrate führt, was als Folge der Suppression

von NO sowie der Reduktion von Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) anzusehen ist [Yamaguchi, Kidachi et al. 2008]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Gabe von L-NAME zu einer Hemmung sowohl der endothelialen wie auch der induzierbaren NO-Synthase führt und damit zu geringeren Spiegeln von NO und auch von VEGF [Shang, Li et al. 2006]. Dies könnte eine Erklärung sein, warum im vorliegenden Modell auch unter L-NAME-Gabe keine Hinweise für Angiogenese vorlagen.

7.3. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann man aus der von uns durchgeführten Studie schließen, dass sowohl das NO-System als auch das Endothelin-System in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie und dem damit verbundenen Problem der Ischämie eine bedeutende Rolle spielen. Die anhaltende Ischämie, welcher als Folge der Lappenhebung das Gewebe ausgesetzt war, führte zu einer Ausbildung einer deutlichen Gewebenekrose in den Kontrolltieren. Eine Vorbehandlung mit dem Substrat der NO-Synthase, dem L-Arginin, war in der Lage, die Gewebenekrose im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrolltieren leicht, wenn auch nicht signifikant zu reduzieren. Die Tatsache, dass die kompetitive Blockade dieser NO-Synthase durch die Vorbehandlung mit L-NAME zu einer signifikant höher ausgebildeten nekrotischen Gewebefläche führte, beweist den engen Zusammenhang zwischen NO-System und dadurch vermittelter Gefäßdilatation und Nekrose nach anhaltender Ischämie. Erwartungsgemäß konnte eine verbesserte Perfusion insbesondere in den präkapillaren Arteriolen die nutritive Perfusion des Lappengewebes aufrecht erhalten und somit die Nekrose des Lappengewebes geringfügig zu reduzieren. Warum wir trotz der deutlich verbesserten nutritiven Perfusion im Vergleich zur NaCl-behandelten Kontrollgruppe keine signifikante Reduktion der nekrotischen Gewebefläche beobachten konnten, könnte auf die Nebenwirkungen der NO-Synthase zurückzuführen sein. Schließlich gehen hohe Spiegel von NO stets auch mit einer hohen Konzentration an freien Radikalen einher, welche das Gewebe zusätzlich schädigen können. Eine weitere wichtige Erkenntnis aus unserer Studie ist, dass hinsichtlich einer Vorbehandlung kritisch perfundierten Gewebes mit L-Arginin die Dosis keine wesentliche Rolle spielt, sowohl in den Gruppen, welche mit der einfachen Dosierung vorbehandelt wurden, als auch in den mit einer doppelten Dosierung von 20 mg/kg KG zeigte sich ein vergleichbarer Effekt. Die Nekrose konnte in beiden Gruppen reduziert werden. Erwartungsgemäß führte die kompetitive Blockade der NO-Synthase zu

einer signifikanten Erhöhung der nekrotischen Gewebefläche, welche als Folge der signifikant reduzierten nutritiven Perfusion, insbesondere im kritisch perfundierten distalen Lappenanteil, betrachtet werden kann. Obwohl wir aufgrund der mit NO einhergehenden Freisetzung von VEGF eine Angiogenese in unserem Modell, insbesondere in den mit L-Arginin vorbehandelten Tieren, erwarteten, konnten wir zu keinem der Beobachtungszeitpunkte innerhalb unserer Versuchsreihe neugebildete Gefäße beobachten. Auch der Stimulus der anhaltenden Hypoxie führte zu keiner Ausbildung von Gefäßknospen.

Die Beeinflussung der Endothelinsystems in unserem Versuchsmodell konnte das Lappenüberleben und die Ausbildung der Nekrose beeinflussen. Entgegen ursprünglicher Erwartungen zeigte nicht die Blockade des ETA-Rezeptors den größten Einfluss auf das Lappenüberleben, sondern die selektive ETB-Rezeptorblockade. Diese führte über den gesamten Versuchszeitraum von 10 Tagen zu einer signifikant erhöhten nutritiven Perfusion, sodass neben einer verbesserten arteriolen Perfusion auch die Gewebenekrose deutlich reduziert werden konnte. Insbesondere die venuläre Drainage wurde durch die selektive ETB-Rezeptorblockade gesteigert, was nicht zuletzt auch zu einem verbesserten Lappenüberleben führte. Die selektive Blockade des ETA-Rezeptors dagegen führte ebenso wie die unspezifische ETAB-Rezeptorblockade zu keiner wesentlichen Änderung der Gewebenekrose im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Neben den bereits erwähnten verbesserten Perfusionsbedingungen durch die selektive ETB-Rezeptorblockade konnten wir auch einen direkten antiapoptotischen Effekt für den selektiven ETB-Rezeptorblocker nachweisen. An allen Beobachtungszeitpunkten zeigte sich in der mit dem selektiven ETB-Rezeptorblocker vorbehandelten Gruppe eine signifikant niedrigere Zahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu den übrigen Gruppen und den unbehandelten Kontrollen. Einen erwarteten angiogenen Effekt durch die systematische Vorbehandlung mit den unterschiedlichen Endothelinblockern konnten wir in keiner der Gruppen beobachten. Ebenso beobachteten wir auch in den NaCl-behandelten Tieren der Kontrollgruppe trotz des Stimulus der anhaltenden Ischämie keine Anzeichen für eine Neubildung von Gefäßen.

7.4. Ausblick

Betrachtet man nun abschließend die oben vorgestellten Ergebnisse unserer Studie, lassen sich einige Zukunftsaspekte zusammenfassen. Am wichtigsten ist zu nennen, dass es durchaus möglich ist, ein Gewebe, welches wie in der Lappenchirurgie einer anhaltenden Ischämie ausgesetzt sein wird, so vorzubehandeln, dass eine drohende

Lappennekrose möglichst gering gehalten wird. Insbesondere in der rekonstruktiven Chirurgie, in der ein Großteil aller Eingriffe als Elektivoperation durchgeführt wird, spielt diese Erkenntnis eine bedeutende Rolle. So wäre es in Zukunft durchaus denkbar, dass im Vorfeld einer geplanten Lappenplastik, der Patient bzw. das Gewebe mit einer der von uns untersuchten Substanzen vorbehandelt wird, um so die nutritive Perfusion zu verbessern und das resultierende Gewebeabsterben zu verhindern. Ob es sich dabei um L-Arginin oder den selektiven ETB-Rezeptorblocker handeln muss, lässt sich zur jetzigen Zeit noch nicht sicher sagen. Dafür müssten noch weitere Studien durchgeführt werden, um das in unserem Versuchsmodell vorliegende Versuchsprotokoll von der Maus auf den Menschen zu übertragen. Insbesondere bei den Endothelinrezeptorblockern sind weitere Studien notwendig, nicht zuletzt aufgrund der bereits oben beschriebenen Organ- und Speziesheterogenität der unterschiedlichen Endothelinrezeptoren.

Ein weiterer interessanter Aspekt bzgl. der vorliegenden Studie könnte in Zukunft sein, dass man neben einer Vorbehandlung ggf. auch eine Therapie von kritisch perfundiertem Gewebe durchführbar sein könnte. Beispielsweise würde der von uns postulierte direkte antiapoptotische Effekt der selektiven ETB-Rezeptorblockade dafür in Frage kommen [Shichiri, Marumo et al. 1998]. Bereits in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Endothelin in vitro signifikant die Anzahl apoptotischer Zellen reduziert. Da diese Reduktion eng mit einer gesteigerten Expression an ETB-Rezeptoren korrelierte, scheint der ETB-Rezeptor und seine selektive Blockade für die Reduktion des Zelltodes verantwortlich zu sein [Cervar-Zivkovic, Hu et al. 2007]. Eine weitere Untersuchung an allogenen Lungentransplantaten im Kaninchenmodell konnte einen antiapoptischen Effekt durch kombinierte Blockade mittels ETAB-Rezeptorblockern nachweisen [Shaw, Shennib et al. 2001]. Hinsichtlich der Vielfalt an Studien zum Einfluss von Endothelin und den verschiedenen Endothelinrezeptoren auf den apoptotischen Zelltod, kann man in Bezug auf unser Versuchsmodell durchaus in Erwägung ziehen, dass in Zukunft in einem kritisch durchbluteten Gewebe therapeutisch ein selektiver ETB-Rezeptorblocker gegeben werden könnte, um den apoptotischen Zelltod zu verhindern.

Ein weiterer Punkt, der in künftigen Studien interessant zu untersuchen sein könnte, wäre der Einfluss der unterschiedlichen Endothelinrezeptoren auf die Bildung freier Sauerstoffradikale und die damit verbundene Aktivierung von Leukozyten. So ist neben der bereits erwähnten Produktion von radikalen Sauerstoffspezies [Dong, Zhang et al. 2005] zusätzlich noch bekannt, dass Endothelin auch über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase die Produktion von Superoxid fördert [Fellner and Arendshorst 2007]. Welcher der beiden Subtypen der Rezeptoren dafür verantwortlich ist, ist jedoch nicht bekannt. Ebenso wurden noch keine Studien durchgeführt, die geklärt haben, inwieweit die selektive ETA-, ETB bzw. die kombinierte ETAB-Rezeptorblockade die vermehrte

Produktion von Superoxid beeinflussen kann. Letzteres würden wir nach Lappenhebung in höherem Ausmaß erwarten, schließlich ist aus älteren Studien bekannt ist, dass nach Lappenhebung Endothelin vermehrt nachgewiesen werden kann [Matsuzaki 1993; Lantieri, Carayon et al. 2003; Mobley, Glassberg et al. 2003]. Auch der genaue Einfluss, der von uns verwendeten Substanzen auf den systemischen Blutdruck der Versuchstiere wäre einer interessanter Beobachtungsparameter für künftige Studien.

Analog zu den Versuchen mit den unterschiedlichen Endothelinrezeptorblockern lassen auch die Ergebnisse des zweiten Versuchsabschnitts einen günstigen Ausblick in die Zukunft der rekonstruktiven Chirurgie offen. So könnte auch die Behandlung mit der Aminosäure L-Arginin als Substrat der NO-Synthase einen Ansatzpunkt zur Präkonditionierung von kritisch ischämischem Gewebe darstellen. Ziel wäre auch hier durch eine geeignete Vorbehandlung des entsprechenden Gewebes das Entstehen einer Gewebenekrose zu verhindern. Aus unseren Ergebnissen lässt sich mutmaßen, dass die L-Arginin-Gabe dabei keinen dosisabhängigen Einfluss hat. Die Tatsache, dass die Blockade der NO-Synthase mittels L-NAME eine deutlich höhere Nekroseentwicklung bewirkte, verdeutlicht ebenfalls die wichtige Rolle des endogenen NO-Systems beim Überleben von kritisch ischämischem Gewebe.

8. Literaturverzeichnis

1. A. Hirner, K. W. (2008). Chirurgie, Georg Thieme Verlag.
2. Alemayehu, A., K. R. Lock, et al. (1994). "L-NAME, nitric oxide and jejunal motility, blood flow and oxygen uptake in dogs." Br J Pharmacol **111**(1): 205-12.
3. Alizadeh, N., B. Pittet, et al. (2004). "Active-site inactivated FVIIa decreases thrombosis and necrosis in a random skin flap model of acute ischemia." J Surg Res **122**(2): 263-73.
4. Ames, A., 3rd, R. L. Wright, et al. (1968). "Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon." Am J Pathol **52**(2): 437-53.
5. Amon, M., M. W. Laschke, et al. (2006). "Impact of severity of local soft-tissue trauma on long-term manifestation of microcirculatory and microlymphatic dysfunctions." J Trauma **61**(4): 924-32.
6. Amon, M., M. D. Menger, et al. (2003). "Heme oxygenase and nitric oxide synthase mediate cooling-associated protection against TNF-alpha-induced microcirculatory dysfunction and apoptotic cell death." Faseb J **17**(2): 175-85.
7. Arai, H., S. Hori, et al. (1990). "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor." Nature **348**(6303): 730-2.
8. Astrup, J., B. K. Siesjo, et al. (1981). "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra." Stroke **12**(6): 723-5.
9. Bagnato, A. and F. Spinella (2003). "Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis." Trends Endocrinol Metab **14**(1): 44-50.
10. Banic, A., W. Boeckx, et al. (1995). "Late results of breast reconstruction with free TRAM flaps: a prospective multicentric study." Plast Reconstr Surg **95**(7): 1195-204; discussion 1205-6.
11. Beauchamp, P., V. Richard, et al. (1999). "Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation." Circulation **100**(5): 541-6.
12. Biemer, E. (1991). Die plastische Chirurgie - Aufgaben und Möglichkeiten. Dt. Ärztebl. **88**: 1049-54.
13. Black, C. E., N. Huang, et al. (2003). "Vasoconstrictor effect and mechanism of action of endothelin-1 in human radial artery and vein: implication of skin flap vasospasm." J Cardiovasc Pharmacol **41**(3): 460-7.
14. Bode-Boger, S. M., R. H. Boger, et al. (1998). "L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship." Br J Clin Pharmacol **46**(5): 489-97.
15. Boger, R. H. (2004). "Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor." J Nutr **134**(10 Suppl): 2842S-2847S; discussion 2853S.
16. Boldrini, L., S. Pistolesi, et al. (2006). "Expression of endothelin 1 and its angiogenic role in meningiomas." Virchows Arch **449**(5): 546-53.
17. Cai, Z., Y. Pang, et al. (2001). "Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain." Brain Res **898**(1): 126-35.
18. Carroll, C. M., S. M. Carroll, et al. (1997). "Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival." Plast Reconstr Surg **100**(1): 58-65.
19. Cattaruzza, M., C. Dimigen, et al. (2000). "Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells." Faseb J **14**(7): 991-8.
20. Cervar-Zivkovic, M., C. Hu, et al. (2007). "Endothelin-1 attenuates apoptosis in cultured trophoblasts from term human placentas." Reprod Sci **14**(5): 430-9.
21. Chow, J. W., S. W. Fox, et al. (1998). "Role of nitric oxide and prostaglandins in mechanically induced bone formation." J Bone Miner Res **13**(6): 1039-44.
22. Clemens, M. G., P. F. McDonagh, et al. (1985). "Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment." Am J Physiol **248**(6 Pt 2): H804-11.
23. Cleveland, J. C., Jr., D. R. Meldrum, et al. (1997). "Preconditioning and hypothermic cardioplegia protect human heart equally against ischemia." Ann Thorac Surg **63**(1): 147-52.
24. Cruz, A., C. Parnot, et al. (2001). "Endothelin-1, a regulator of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane." J Vasc Res **38**(6): 536-45.
25. De Angelis, K., T. Ogawa, et al. (2006). "Impairment on cardiac output and blood flow adjustments to exercise in L-NAME-induced hypertensive rats." J Cardiovasc Pharmacol **47**(3): 371-6.
26. de la Torre, J. C., A. Cada, et al. (1997). "Reduced cytochrome oxidase and memory dysfunction after chronic brain ischemia in aged rats." Neurosci Lett **223**(3): 165-8.
27. Dodd, F., M. Limoges, et al. (2000). "L-arginine inhibits apoptosis via a NO-dependent mechanism in Nb2 lymphoma cells." J Cell Biochem **77**(4): 624-34.

28. Dong, F., X. Zhang, et al. (2005). "Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1." *Br J Pharmacol* **145**(3): 323-33.
29. Du, Z. Y., M. Hicks, et al. (1996). "Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat." *J Heart Lung Transplant* **15**(12): 1258-67.
30. Eppihimer, M. J. and D. N. Granger (1997). "Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules." *Shock* **8**(1): 16-25.
31. Erni, D. and Y. D. Harder (2003). "The dissection of the rectus abdominis myocutaneous flap with complete preservation of the anterior rectus sheath." *Br J Plast Surg* **56**(4): 395-400.
32. Erni, D., R. Wessendorf, et al. (2001). "Endothelin receptor blockade improves oxygenation in contralateral TRAM flap tissue in pigs." *Br J Plast Surg* **54**(5): 412-8.
33. Fan, H., B. Sun, et al. (2002). "Oxygen radicals trigger activation of NF-kappaB and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(5): H1778-86.
34. Fang, X., W. Tang, et al. (2006). "Cardiopulmonary resuscitation in a rat model of chronic myocardial ischemia." *J Appl Physiol* **101**(4): 1091-6.
35. Fellner, S. K. and W. Arendshorst (2007). "Endothelin-A and -B receptors, superoxide, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles." *Am J Physiol Renal Physiol* **292**(1): F175-84.
36. Fellner, S. K. and L. A. Parker (2004). "Endothelin B receptor Ca²⁺ signaling in shark vascular smooth muscle: participation of inositol triphosphate and ryanodine receptors." *J Exp Biol* **207**(Pt 19): 3411-7.
37. Filep, J. G., M. G. Sirois, et al. (1991). "Effects of endothelin-1 on vascular permeability in the conscious rat: interactions with platelet-activating factor." *Br J Pharmacol* **104**(4): 797-804.
38. Forstermann, U., J. S. Pollock, et al. (1994). "Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation." *Methods Enzymol* **233**: 258-64.
39. Friehs, I., A. M. Moran, et al. (2004). "Promoting angiogenesis protects severely hypertrophied hearts from ischemic injury." *Ann Thorac Surg* **77**(6): 2004-10; discussion 2011.
40. Fukuroda, T., T. Fujikawa, et al. (1994). "Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats." *Biochem Biophys Res Commun* **199**(3): 1461-5.
41. Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* **288**(5789): 373-6.
42. Gao, X. K., B. Yang, et al. (2003). "[Protective effect of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on germ cell apoptosis in experimentally cryptorchid rats]." *Zhonghua Nan Ke Xue* **9**(9): 684-6, 689.
43. Gerbert, F. (1995). Die Macht der Schönheit. *Focus* **26**: 134-142.
44. Glazier, S. S., D. M. O'Rourke, et al. (1994). "Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain." *J Cereb Blood Flow Metab* **14**(4): 545-53.
45. Gokce, N. (2004). "L-arginine and hypertension." *J Nutr* **134**(10 Suppl): 2807S-2811S; discussion 2818S-2819S.
46. Goligorsky, M. S., A. S. Budzikowski, et al. (1999). "Co-operation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**(3): 269-71.
47. Granger, D. N., G. Rutili, et al. (1981). "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia." *Gastroenterology* **81**(1): 22-9.
48. Grisham, M. B., L. A. Hernandez, et al. (1986). "Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia." *Am J Physiol* **251**(4 Pt 1): G567-74.
49. Gross, J. F. and J. Aroesty (1972). "Mathematical models of capillary flow: a critical review." *Biorheology* **9**(4): 225-64.
50. Halcox, J. P., K. R. Nour, et al. (2007). "Endogenous endothelin in human coronary vascular function: differential contribution of endothelin receptor types A and B." *Hypertension* **49**(5): 1134-41.
51. Hammersen, F., A. Unterberg, et al. (1988). "The ultrastructural basis of interactions between leukocytes and endothelium." *Adv Exp Med Biol* **242**: 77-84.
52. Harder, Y., M. Amon, et al. (2004). "Evolution of ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy." *J Surg Res* **121**(2): 197-205.
53. Harder, Y., M. Amon, et al. (2005). "Evolution of a 'falx lunatica' in demarcation of critically ischemic myocutaneous tissue." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**(3): H1224-32.
54. Hassid, A. and J. P. Oudinet (1986). "Relationship between cellular calcium and prostaglandin synthesis in cultured vascular smooth muscle cells." *Prostaglandins* **32**(3): 457-78.
55. Haynes, W. G., J. P. Noon, et al. (1993). "L-NMMA increases blood pressure in man." *Lancet* **342**(8876): 931-2.
56. Hergenroder, S., K. Munter, et al. (1998). "Effects of endothelin and endothelin receptor antagonism in arteriolar and venolar microcirculation." *Vasa* **27**(4): 216-9.
57. Hickey, K. A., G. Rubanyi, et al. (1985). "Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells." *Am J Physiol* **248**(5 Pt 1): C550-6.
58. Hirata, Y., T. Emori, et al. (1993). "Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells." *J Clin Invest* **91**(4): 1367-73.
59. Hotter, G., D. Closa, et al. (1996). "Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide." *Biochem Biophys Res Commun* **222**(1): 27-32.

60. Im, M. J., P. N. Manson, et al. (1985). "Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps." *Ann Surg* **201**(3): 357-9.
61. Inoue, H., M. Aihara, et al. (1998). "Changes in endothelin-1, 6-keto-PG-F1 alpha, and TX-B2 in random pattern flaps." *J Cardiovasc Pharmacol* **31 Suppl 1**: S477-9.
62. Ito, Y., M. Katori, et al. (1996). "Constriction of mouse hepatic venules and sinusoids by endothelins through ETB receptor subtype." *Int J Microcirc Clin Exp* **16**(5): 250-8.
63. Jones, T. H., R. B. Morawetz, et al. (1981). "Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys." *J Neurosurg* **54**(6): 773-82.
64. Joshi, M. (1997). "The importance of L-arginine metabolism in melanoma: an hypothesis for the role of nitric oxide and polyamines in tumor angiogenesis." *Free Radic Biol Med* **22**(3): 573-8.
65. Josko, J., S. Hendryk, et al. (2001). "Cerebral angiogenesis after subarachnoid hemorrhage (SAH) and endothelin receptor blockage with BQ-123 antagonist in rats." *J Physiol Pharmacol* **52**(2): 237-48.
66. Kaminski, K. A., T. A. Bonda, et al. (2002). "Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury." *Int J Cardiol* **86**(1): 41-59.
67. Karow Thomas, L.-R. R. (2007). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Pulheim.
68. Kevin, L. G., E. Novalija, et al. (2005). "Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice." *Anesth Analg* **101**(5): 1275-87.
69. Khouri, R. K., B. C. Cooley, et al. (1998). "A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome." *Plast Reconstr Surg* **102**(3): 711-21.
70. Klinke, R., Silbernagl, S. (2001). *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
71. Klyszcz, T., M. Junger, et al. (1997). "[Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]." *Biomed Tech (Berl)* **42**(6): 168-75.
72. Komorowska-Timek, E., T. A. Timek, et al. (2004). "Oral administration of L-arginine decreases necrosis of the epigastric skin flap in the rat." *Ann Plast Surg* **53**(1): 73-8.
73. Komorowska-Timek, E., T. A. Timek, et al. (2004). "The effect of single administration of vascular endothelial growth factor or L-arginine on necrosis and vasculature of the epigastric flap in the rat model." *Br J Plast Surg* **57**(4): 317-25.
74. Konopka, C. L., A. Jurach, et al. (2007). "Experimental model for the study of chronic renal ischemia in rats: morphologic, histological and ultra-structural analysis." *Acta Cir Bras* **22**(1): 12-21.
75. Krupp (1994). *Plastische Chirurgie - Klinik und Praxis*. Landsberg, ecomed Verlagsgesellschaft AG & CO.KG
76. Lahav, R., M. L. Suva, et al. (2004). "Endothelin receptor B inhibition triggers apoptosis and enhances angiogenesis in melanomas." *Cancer Res* **64**(24): 8945-53.
77. Lantieri, L. A., A. Carayon, et al. (2003). "Tissue and plasma levels of endothelin in free flaps." *Plast Reconstr Surg* **111**(1): 85-91.
78. Leaf, A. (1973). "Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury." *Circulation* **48**(3): 455-8.
79. Lehr, H. A., A. Guhlmann, et al. (1991). "Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster." *J Clin Invest* **87**(6): 2036-41.
80. Lehr, H. A., M. Leunig, et al. (1993). "Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice." *Am J Pathol* **143**(4): 1055-62.
81. Lewis, M. S., R. E. Whatley, et al. (1988). "Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion." *J Clin Invest* **82**(6): 2045-55.
82. Lipa, J. E., P. C. Neligan, et al. (1999). "Vasoconstrictor effect of endothelin-1 in human skin: role of ETA and ETB receptors." *Am J Physiol* **276**(2 Pt 2): H359-67.
83. Liu, P., B. Xu, et al. (2002). "L-NAME enhances microcirculatory congestion and cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemia-reperfusion in rats." *Shock* **17**(3): 185-92.
84. Liu, X., R. M. Engelman, et al. (1992). "Heat shock. A new approach for myocardial preservation in cardiac surgery." *Circulation* **86**(5 Suppl): II358-63.
85. Lopez, A., J. A. Lorente, et al. (2004). "Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock." *Crit Care Med* **32**(1): 21-30.
86. Loscalzo, J. (2004). "L-arginine and atherothrombosis." *J Nutr* **134**(10 Suppl): 2798S-2800S; discussion 2818S-2819S.
87. Mackie, K., Y. Lai, et al. (1986). "Protein phosphorylation in cultured endothelial cells." *J Cell Physiol* **128**(3): 367-74.
88. MacMillan-Crow, L. A., J. E. Murphy-Ullrich, et al. (1994). "Identification and possible localization of cGMP-dependent protein kinase in bovine aortic endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **201**(2): 531-7.
89. Manson, P. N., R. M. Anthenelli, et al. (1983). "The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps." *Ann Surg* **198**(1): 87-90.
90. Manson, P. N., K. K. Narayan, et al. (1986). "Improved survival in free skin flap transfers in rats." *Surgery* **99**(2): 211-5.
91. Matsuzaki, K. (1993). "Effect of skin flap ischemia on plasma endothelin-1 levels." *Ann Plast Surg* **31**(6): 499-503.

92. Mazzoni, M. C., P. Borgstrom, et al. (1990). "Capillary narrowing in hemorrhagic shock is rectified by hyperosmotic saline-dextran reinfusion." *Circ Shock* **31**(4): 407-18.
93. McCord, J. M. (1986). "Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation." *J Free Radic Biol Med* **2**(5-6): 307-10.
94. McDonald, W. S., T. P. Lo, Jr., et al. (2004). "Role of nitric oxide in skin flap delay." *Plast Reconstr Surg* **113**(3): 927-31.
95. Meldrum, D. G., L. L. Stephenson, et al. (1999). "Effects of L-NAME and L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle." *Plast Reconstr Surg* **103**(3): 935-40.
96. Menger, M. D., J. H. Barker, et al. (1992). "Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle." *Plast Reconstr Surg* **89**(6): 1104-14.
97. Menger, M. D. and K. Messmer (1993). "[Microcirculation of skeletal muscle after ischemia and reperfusion]." *Wien Med Wochenschr* **143**(7-8): 148-58.
98. Menger, M. D., S. Pelikan, et al. (1992). "Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox"." *Am J Physiol* **263**(6 Pt 2): H1901-6.
99. Menger, M. D., F. U. Sack, et al. (1988). "Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution." *Res Exp Med (Berl)* **188**(3): 151-65.
100. Menger, M. D., F. U. Sack, et al. (1989). "Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effect of prophylactic isovolemic hemodilution." *Adv Exp Med Biol* **248**: 387-95.
101. Menger, M. D., D. Steiner, et al. (1992). "Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow"." *Am J Physiol* **263**(6 Pt 2): H1892-900.
102. Menger, M. D. and B. Vollmar (1994). "In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin." *Microsurgery* **15**(6): 383-9.
103. Menger, M. D. and B. Vollmar (1996). "Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research." *Br J Surg* **83**(5): 588-601.
104. Mitchell, D., J. Yu, et al. (1997). "Comparable effects of arteriolar and capillary stimuli on blood flow in rat skeletal muscle." *Microvasc Res* **53**(1): 22-32.
105. Mobley, S. R., M. K. Glassberg, et al. (2003). "Expression of endothelin 1 in rat random-pattern skin flaps treated with topical nifedipine." *Arch Facial Plast Surg* **5**(1): 78-82.
106. Moran, S. L., G. Nava, et al. (2003). "An outcome analysis comparing the thoracodorsal and internal mammary vessels as recipient sites for microvascular breast reconstruction: a prospective study of 100 patients." *Plast Reconstr Surg* **111**(6): 1876-82.
107. Moran, S. L. and J. M. Serletti (2001). "Outcome comparison between free and pedicled TRAM flap breast reconstruction in the obese patient." *Plast Reconstr Surg* **108**(7): 1954-60; discussion 1961-2.
108. Murry, C. E., R. B. Jennings, et al. (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* **74**(5): 1124-36.
109. Nahabedian, M. Y., B. Momen, et al. (2004). "Factors associated with anastomotic failure after microvascular reconstruction of the breast." *Plast Reconstr Surg* **114**(1): 74-82.
110. Nakai, Y., P. Voisine, et al. (2005). "Effects of L-arginine on the endogenous angiogenic response in a model of hypercholesterolemia." *Surgery* **138**(2): 291-8.
111. Niebauer, J., S. P. Schwarzacher, et al. (1999). "Local L-arginine delivery after balloon angioplasty reduces monocyte binding and induces apoptosis." *Circulation* **100**(17): 1830-5.
112. Nucci, C., S. Piccirilli, et al. (1996). "N omega-nitro-L-arginine methyl ester prevents apoptosis induced in the lateral geniculate nucleus by light deprivation in adult rabbit." *Neuroreport* **7**(18): 2863-6.
113. Ozyazgan, I., M. Ozkose, et al. (2007). "Nitric oxide in flow-through venous flaps and effects of L-arginine and nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on nitric oxide and flap survival in rabbits." *Ann Plast Surg* **59**(5): 550-7.
114. Paige, K. T., J. Bostwick, 3rd, et al. (1998). "A comparison of morbidity from bilateral, unipedicled and unilateral, unipedicled TRAM flap breast reconstructions." *Plast Reconstr Surg* **101**(7): 1819-27.
115. Palmer, R. M., D. S. Ashton, et al. (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." *Nature* **333**(6174): 664-6.
116. Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* **327**(6122): 524-6.
117. Palmer, R. M., D. D. Rees, et al. (1988). "L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation." *Biochem Biophys Res Commun* **153**(3): 1251-6.
118. Pang, C. Y., R. Z. Yang, et al. (1995). "Vascular effects and mechanism of action of endothelin-1 in isolated perfused pig skin." *J Appl Physiol* **79**(6): 2106-13.
119. Pang, C. Y., R. Z. Yang, et al. (1995). "Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig." *Cardiovasc Res* **29**(6): 782-8.
120. Patel, K. D., G. A. Zimmerman, et al. (1991). "Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils." *J Cell Biol* **112**(4): 749-59.
121. Peralta, C., D. Closa, et al. (1996). "Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin." *Biochem Biophys Res Commun* **229**(1): 264-70.
122. Plusczyk, T., B. Witzel, et al. (2003). "ETA and ETB receptor function in pancreatitis-associated microcirculatory failure, inflammation, and parenchymal injury." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**(1): G145-53.

123. Pollock, D. M. and T. J. Opgenorth (1993). "Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA receptor activation." *Am J Physiol* **264**(1 Pt 2): R222-6.
124. Randsmø, J. (1991). Biological role of nitric oxide in platelet function. *Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system*. M. S. H. E. B. JR., EPICOMPLET: 45-56.
126. Reinisch, J. F. (1974). "The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon." *Plast Reconstr Surg* **54**(5): 585-98.
127. Riepe, M. W., F. Esclaire, et al. (1997). "Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning". " *J Cereb Blood Flow Metab* **17**(3): 257-64.
128. Rooks, M. D., J. S. Gould, et al. (1991). "Effects of venous hypertension on rabbit free flap survival." *Microsurgery* **12**(4): 253-61.
129. Saito, Y., K. Nakao, et al. (1990). "Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension." *N Engl J Med* **322**(3): 205.
130. Sakurai, T., M. Yanagisawa, et al. (1990). "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor." *Nature* **348**(6303): 732-5.
131. Schmid-Schonbein, G. W. (1987). "Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation." *Fed Proc* **46**(7): 2397-401.
132. Schmid-Schonbein, G. W., K. L. Sung, et al. (1981). "Passive mechanical properties of human leukocytes." *Biophys J* **36**(1): 243-56.
133. Schmidt-Tintemann, U. (1970). *Grundzüge der plastischen Chirurgie*. München, Urban & Schwarzenberg.
134. Seo, B., B. S. Oemar, et al. (1994). "Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels." *Circulation* **89**(3): 1203-8.
135. Shang, Z. J., Z. B. Li, et al. (2006). "In vitro effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on oral squamous cell carcinoma: a preliminary study." *Int J Oral Maxillofac Surg* **35**(6): 539-43.
136. Shaw, M. J., H. Shennib, et al. (2001). "Effect of endothelin receptor antagonist on lung allograft apoptosis and NOSII expression." *Ann Thorac Surg* **72**(2): 386-90.
137. Shichiri, M., F. Marumo, et al. (1998). "Endothelin-B receptor-mediated suppression of endothelial apoptosis." *J Cardiovasc Pharmacol* **31** Suppl 1: S138-41.
138. Siemens, J. (2004) "Die Macht der Schönheit." *Stern.de* Volume, DOI:
139. Silver, I. A. (1977). "Ion fluxes in hypoxic tissues." *Microvasc Res* **13**(3): 409-20.
140. Slaaf, D. W., R. S. Reneman, et al. (1987). "Cessation and onset of muscle capillary flow at simultaneously reduced perfusion and transmural pressure." *Int J Microcirc Clin Exp* **6**(3): 215-24.
141. Suschek, C. V., V. Kirschel, et al. (1999). "Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation." *J Biol Chem* **274**(10): 6130-7.
142. Suzuki, J. (2005). "Microvascular angioadaptation after endurance training with L-arginine supplementation in rat heart and hindleg muscles." *Exp Physiol* **90**(5): 763-71.
143. Suzuki, J. (2006). "L-arginine supplementation causes additional effects on exercise-induced angiogenesis and VEGF expression in the heart and hind-leg muscles of middle-aged rats." *J Physiol Sci* **56**(1): 39-44.
144. Tan, X., J. Q. Pan, et al. (2005). "L-Arginine inhibiting pulmonary vascular remodelling is associated with promotion of apoptosis in pulmonary arterioles smooth muscle cells in broilers." *Res Vet Sci* **79**(3): 203-9.
145. Tanaka, N., A. Yamaguchi, et al. (2003). "Sternocleidomastoid myocutaneous flap for intraoral reconstruction after resection of oral squamous cell carcinoma." *J Oral Maxillofac Surg* **61**(10): 1179-83.
146. Turman, M. A. and C. M. Bates (1997). "Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells." *Ren Fail* **19**(1): 47-60.
147. Um, S. C., S. Suzuki, et al. (1998). "Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap." *Plast Reconstr Surg* **101**(3): 785-92.
148. Voisine, P., J. Li, et al. (2005). "Effects of L-arginine on fibroblast growth factor 2-induced angiogenesis in a model of endothelial dysfunction." *Circulation* **112**(9 Suppl): I202-7.
149. Waldman, S. A. and F. Murad (1988). "Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system." *J Cardiovasc Pharmacol* **12** Suppl 5: S115-8.
150. Wang, J., X. Wang, et al. (2002). "Effect of L-NAME on pulmonary arterial pressure, plasma nitric oxide and pulmonary hypertension syndrome morbidity in broilers." *Br Poult Sci* **43**(4): 615-20.
151. Watanabe, S., H. Ono, et al. (2000). "Calcium antagonist inhibits glomerular cell apoptosis and injuries of L-NAME exacerbated nephrosclerosis in SHR." *Hypertens Res* **23**(6): 683-91.
152. Wei, F. C., N. Celik, et al. (2002). "Combined anterolateral thigh flap and vascularized fibula osteoseptocutaneous flap in reconstruction of extensive composite mandibular defects." *Plast Reconstr Surg* **109**(1): 45-52.
153. Weiss, S. J. (1989). "Tissue destruction by neutrophils." *N Engl J Med* **320**(6): 365-76.
154. Westermann, S., B. Vollmar, et al. (1999). "Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle." *Surgery* **126**(5): 881-9.
155. Wettstein, R., P. Morsdorf, et al. (2007). "Selective blockade of endothelin-B receptor improves survival of critically perfused musculocutaneous flaps." *Langenbecks Arch Surg* **392**(3): 331-8.

156. Wu, C. T., Y. F. Ren, et al. (2007). "[L-arginine reduces intestinal epithelial cell apoptosis in rats with severe abdominal infection]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **27**(11): 1728-30.
157. Wu, G., C. J. Meininger, et al. (2000). "Arginine nutrition in development, health and disease." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **3**(1): 59-66.
158. Wulfig, P., C. Kersting, et al. (2004). "Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer." Clin Cancer Res **10**(7): 2393-400.
159. Yamaguchi, H., Y. Kidachi, et al. (2008). "L: -NAME inhibits tumor cell progression and pulmonary metastasis of r/m HM-SFME-1 cells by decreasing NO from tumor cells and TNF-alpha from macrophages." Mol Cell Biochem.
160. Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels." J Hypertens Suppl **6**(4): S188-91.
161. Yunoki, M., S. Nishio, et al. (2002). "Characteristics of hypothermic preconditioning influencing the induction of delayed ischemic tolerance." J Neurosurg **97**(3): 650-7.
162. Zeis, E. (1838). Handbuch der plastischen Chirurgie. Berlin, Reimer.
163. Zhang, J., J. E. Lipa, et al. (2000). "Pharmacological characterization of vasomotor activity of human musculocutaneous perforator artery and vein." J Appl Physiol **89**(6): 2268-75.
164. Ziche, M., L. Morbidelli, et al. (1996). "Angiogenesis." Exp Nephrol **4**(1): 1-14.

9. Danksagung

Zuletzt möchte ich mich gerne bei den Menschen bedanken, ohne welche diese Arbeit niemals hätte fertig gestellt werden können.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael D. Menger bedanken, dem Leiter des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg/Saar. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas und dafür, dass er mir bei der Durchführung der Versuche stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Die ständige Reevaluation, konstruktive Kritik sowie Diskussion der Ergebnisse und des Modells an sich haben enorm zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch PD. Dr. Yves Harder, der mir als Betreuer zur Seite stand. Dabei ist besonders hervorzuheben, mit welcher Hingabe und Präzision er mich voller Geduld in die Techniken der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, der mikrochirurgischen Präparation sowie der Offline-Auswertung der Daten einführte. Außerdem konnte er durch seinen enormen Einsatz trotz einer räumlichen Entfernung von 500 km zwischen Homburg und Genf stets bei allen Problemen zur Seite stehen und ließ nie Zweifel an einer ausgezeichneten Betreuung aufkommen. Letztlich werden mir wohl insbesondere seine Präzision, seine fachliche Kompetenz und auch sein unermüdlicher Einsatz ebenso wie die Arbeit im Institut der Experimentellen Chirurgie in Erinnerung bleiben. In Zusammenarbeit mit Prof. Menger und Dr. Harder wurde mir wissenschaftliches Arbeiten, wie z.B. der Umgang mit wissenschaftlichen Studien, die Interpretation von Daten sowie das Schreiben wissenschaftlicher Manuskripte sehr nahe gebracht, weshalb ihnen ein großes Stück Dank gebührt.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Mitdoktorandin Frau Annick Bächle bedanken, welche mir stets hilfsbereit zur Seite stand. Außerdem zeigte sie mir insbesondere in Zeiten, in denen Murphys Law für experimentelle Versuche eintrat und alles schief zu gehen schien, oftmals, dass das Glas nicht als halbleer sondern als halbvoll zu sehen ist. Nicht zu vergessen möchte ich mich bei Elisabeth Gluding, Janine Becker, Claudia Scheuer und Michaela Amon bedanken, welche mir stets hilfsbereit zur Seite standen. Ihre Mitarbeit bei Labortätigkeiten und der Erstellung von histologischen Präparaten war ebenso von unschätzbarem Wert wie ihr Beitrag zum guten Arbeitsklima im Institut.

Dank gilt aber auch allen anderen Doktoranden welche mir durch interessierte Diskussion und fachlicher Unterstützung zur Seite standen.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname:	Philipp Mörsdorf
Geburtstag:	26.04.1982
Geburtsort:	St. Wendel
Wohnort:	66424 Homburg, Kirrbergerstr. 32
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Dr. Aloysius Mörsdorf (*09.12.1948) - Zahnarzt Frau Marianne Mörsdorf, geborene Maurer (*17.04.1952) - Zahnarthelferin
Geschwister:	Kerstin Mörsdorf (*18.02.1980) - Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe

Schulbildung:

09/1988 - 07/1992	Grundschule in Oberthal
09/1992 - 06/2001	Gymnasium Wendalinum in St. Wendel Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Durchschnittsnote 1,7)

Ersatzdienst:

10/2001 - 07/2002	Deutsches Rotes Kreuz St. Wendel (Rettungswache)
01/2002	Prüfung als Rettungssanitäter (Note 2,0)

Studium & Beruf :

10/2002 - heute	Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes in Homburg
07/2004	Physikumsprüfung (ärztliche Vorprüfung) mit der Durchschnittsnote 3,0
03/2005 – 2008	Doktorarbeit unter Prof. Dr. M. D. Menger über die Mikrozirkulation perfundierter muskulokutaner Lappen im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg/Saar.
10/2006 - 2008	Arbeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg/Saar
10/2008	schriftlicher Teil des 2. Ärztlichen Staatsexamens an der Universität des Saarlandes, Uniklinik Homburg (Note 3,0)
11/2008	mündlicher Teil des 2. Ärztlichen Staatsexamens an der Universität des Saarlandes, Uniklinik Homburg (Note 2,0).
11/2008	Abschluss des Medizinstudiums an der Universität des Saarlandes, Uniklinik Homburg (Gesamtnote „gut“)
12/2008	Erhalt der Approbation als Arzt durch das

	Landesprüfungsamt für Gesundheitsberufe des Saarlandes
01/2009- heute	Assistenzarzt in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie an der Uniklinik des Saarlandes bei Prof. Dr. med. T. Pohlemann

Veröffentlichungen:

Wettstein R., **Mörsdorf P.**, Bächle A., Amon M., Menger M.D., Harder Y.
“Selective Blockade of Endothelin-B-Receptor improves survival of critically perfused musculocutaneous flaps” - Langenbeck's Archives of Surgery, 2007 May; 392(3):331-8. Epub 2007 Mar 23.

Publizierte Abstracts:

Mörsdorf P., Bächle A., Amon M., Harder Y., Menger M.D.
„Endogen produziertes jedoch nicht exogen induziertes Stickstoffmonoxid reduziert durch Verbesserung der nutritiven Durchblutung die Nekrose in kritisch perfundierten muskulokutanen Lappen“ – Chirurgisches Forum 2006, Springer, Heidelberg, Band 35; 391-393.

Bächle A., **Mörsdorf P.**, Amon M., Harder Y., Menger M.D.
“Effects of anti-oxidative treatment strategies on microcirculation in randomly perfused experimental flaps”- Journal of Vascular Research.

Mörsdorf P., Bächle A., Amon M., Harder Y., Menger M.D.
„Selektive Blockade des Endothelin-B-Rezeptors verbessert durch gesteigerte arterioläre Perfusion das Überleben von kritisch durchbluteten muskulokutanen Lappen“ – Chirurgisches Forum 2007, Springer, Heidelberg, Band 36; 363-365.

Mörsdorf P., Bächle A., Amon M., Harder Y., Menger M.D.
“Selective Blockade of Endothelin-B-Receptor improves survival of critically perfused musculocutaneous flaps” – Langenbeck's Archives of Surgery, May 2007; 331-338.

Bächle A., **Mörsdorf P.**, Amon M., Harder Y., Menger M.D.
„N-Acetylcystein verbessert das Überleben kritisch perfundierter Lappen durch Reduktion der leukozytären Entzündungsreaktion und durch Protektion der nutritiven Kapillarperfusion. – Chirurgisches Forum 2008, Springer, Heidelberg, Band 37; 287-289.

Rezaiean F., Wettstein R., Bäumker K., Amon m., **Mörsdorf P.**, Menger M.D., Pittet B., Harder Y.
„Erythropoetin verbessert das Überleben von kritisch perfundierten Lappen durch Hochregulation von NO und VEGF. – Chirurgisches Forum 2008, Springer, Heidelberg, Band 37; 291-293.

Mörsdorf P., Bächle A., Amon M., Schramm R., Rezaeian F., Vollmar B., Harder Y., Menger M.D.
„Simvastatin vermindert die ischämiebedingte Entzündung und stimuliert die Neovaskularisierung in kritisch durchbluteten Lappen“. – Chirurgisches Forum 2009, Springer, Heidelberg, Band 38; 281-283.

Rezaeian F., Wettstein R., **Mörsdorf P.**, Menger M.D., Harder Y.
Pharmakologische Induktion des „Delay-Phänomens“: Ghrelin, ein gastrointestinales Peptid als Schutz vor ischämischer Haut-Muskelnekrose? – Chirurgisches Forum 2009, Springer, Heidelberg, Band 38; 277-279.

Ausgewählte Vorträge:

Mörsdorf P., Bächle A., Amon M., Harder Y., Menger M.D.

„Endogen produziertes jedoch nicht exogen induziertes Stickstoffmonoxid reduziert durch Verbesserung der nutritiven Durchblutung die Nekrose in kritisch perfundierten muskulokutanen Lappen“ – 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum, Sitzung Plastische Chirurgie, Mai 2006 Berlin

Mörsdorf P., Bächle A., Amon M., Harder Y., Menger M.D.

„Selektive Blockade des Endothelin-B-Rezeptors verbessert durch gesteigerte arterioläre Perfusion das Überleben von kritisch durchbluteten muskulokutanen Lappen“ – 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum, Sitzung Plastische Chirurgie, Mai 2007 München

Mörsdorf P., Bächle A., Amon M., Harder Y., Menger M.D.

“Selective Blockade of Endothelin-B-Receptor improves survival of critically perfused musculocutaneous flaps” – 11. Chirurgische Forschungstage, Postersitzung “Plastische Chirurgie”, November 2007 Saarbrücken

Mörsdorf P., Bächle A., Rezaiean F., Vollmer B., Harder Y., Menger M.D.

“Simvastatin-conditioning of critically perfused tissue reduces necrosis by improving nutritive perfusion and decreasing inflammation”. - 12. Chirurgische Forschungstage, Postersitzung “Biokompatibilität”, September 2008, Freiburg

Mörsdorf P., Bächle A., Amon M., Schramm R., Rezaeian F., Vollmar B., Harder Y., Menger M.D.

„Simvastatin vermindert die ischämiebedingte Entzündung und stimuliert die Neovaskularisierung in kritisch durchbluteten Lappen“. – 126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum, Sitzung Plastische Chirurgie, Mai 2009 München